

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.АКМУЛЛЫ**

Л.А.Гайсина, А.И Фазлутдинова, Р.Р.Кабиров

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ВОДОРОСЛЕЙ**

Учебное пособие

Уфа 2008

УДК 582.26
ББК 28.591
Г 14

*Печатается по решению редакционно-издательского совета
Башкирского государственного педагогического университета
им. М.Акмиллы*

Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р.

Современные методы выделения и культивирования водорослей:
учебное пособие [Текст]. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152с.

Пособие содержит информацию о современных подходах в технике выделения и культивирования микроскопических водорослей. Излагаются этапы исторического развития методов выращивания водорослей. Рассматриваются вопросы стерилизации питательных сред и лабораторной посуды. Представлены данные, касающиеся организации и функционирования коллекции культур водорослей.

Предназначено для студентов и аспирантов биологических специальностей вузов, учителей школ, педагогов дополнительного образования.

Рецензенты: *Г.Г. Кузяхметов, д-р биол. н., проф. (БГУ);
М.Г. Мигранов, д-р биол. н., проф. (БГПУ).*

ISBN 978-5-87978-509-8

© Издательство БГПУ, 2008
© Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И.,
Кабиров Р.Р., 2008
© Гайсина Л.А., обложка., 2008

*Посвящается памяти
Лилии Салаватовны
Хайбуллиной*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Водоросли – древнейшие про- и эукариотические фотосинтезирующие организмы, ведущие свободный и симбиотический образ жизни. Распространенные по всему земному шару, в самых разнообразных местообитаниях, они играют огромную роль в жизни природы и человека.

Эта группа организмов обладает большим разнообразием морфологии, анатомии, онтогенеза, географии и экологии. В связи с этим водоросли являются перспективными объектами для проведения разноплановых научных исследований в области физиологии, биохимии, биофизики, генетики, космической биологии и т.д. Их используют для повышения продуктивности водоемов и плодородия почв, получения биологически активных веществ и различных пищевых и кормовых добавок, в качестве индикаторных организмов при изучении текущего состояния почв и водоемов. В последнее время проводятся исследования, направленные на изучение возможности использования водорослей для получения биотоплива и поглощения углекислого газа из атмосферы.

К сожалению, в настоящее время в плане передовых научных разработок в области альгологии (науки о водорослях) мы отстаем от зарубежных исследователей. И это отставание связано не только с недостаточностью материальной базы, но и с нехваткой научно-методической литературы, отражающей современные тенденции развития альгологии. Особенно остро ощущается недостаток работ, обобщающих опыт ведущих зарубежных и отечественных исследователей в области культивирования водорослей.

Данное учебное пособие представляет собой попытку представить самые последние достижения в области культивирования водорослей. Мы постарались рассмотреть наиболее важные моменты, связанные с экспериментальной работой в области альгологии, и объединили разнообразные сведения, касающиеся методов культивирования, изучения и хранения водорослей.

Пособие «Современные методы выделения и культивирования водорослей» состоит из семи глав. В первой главе представлен исторический обзор этапов развития техники культивирования водорослей в нашей стране и за рубежом. Во второй главе подробно рассматриваются вопросы, связанные с культивированием водорослей с указанием методик приготовления разнообразных питательных сред. В третьей главе данного издания описаны основные технические характеристики микроскопа и правила работы с ним. В четвертой главе подробно рассматриваются методы стерилизации питательных сред и лабораторного оборудования. Пятая и шестая части посвящены новейшим методам выделения водорослей и получения альгологически чистых культур. В седьмой главе представлена информация об основных условиях, необходимых для содержания коллекции культур водорослей. В приложении приведены рецепты основных питательных сред и список терминов по альгологии.

Пособие позволит ориентироваться в разнообразных современных методах выделения, культивирования и хранения водорослей широкому кругу исследователей, а также будет способствовать популяризации знаний о водорослях. Оно будет полезно не только для студентов и аспирантов, изучающих водоросли, но и для широкого круга исследователей, работающих в области экспериментальной биологии.

ГЛАВА 1. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК О РАЗВИТИИ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Многие методы и рецепты основных питательных сред, которые используются в настоящее время, были предложены в конце XIX и начале XX веков. В настоящее время в литературе накоплен значительный фактический материал по методам культивирования водорослей (Moore, 1903; Küster, 1907; Chodat, 1913; Richter, 1913; Pringsheim, 1924, 1946; Kufferath, 1928/29; Lwoff, 1932; Meier, 1932; Vischer 1937; Bold, 1942; Chu, 1942; Brunel et al., 1950; Lewin, 1959; Fogg, 1965; Venkataraman, 1969; Stein, 1973; Guillard, 1975; Richmond, 1986). Многие из этих работ содержат исторические сведения. Дадим краткий обзор основных достижений в культивировании водорослей, начиная с зарождения науки о водорослях и до середины XX века.

1.1. Культивирование водорослей в XIX веке

Немецкий ученый Фердинанд Кох (F.Koch) (1850), основатель бактериологии, смог сохранить одноклеточную жгутиковую водоросль *Haematococcus* (Chlorophyceae) в течение некоторого времени и назвал эту процедуру «культивирование». Свои опыты он проводил в Бреслау (сейчас Вроцлав, Польша). Это была первая опубликованная работа о «культуре» водорослей. Однако в связи с тем, что Ф.Кох в процессе культивирования водоросли не использовал питательную среду, ему не удалось выделить *Haematococcus* из других организмов, и он не смог поддерживать культуру данной водоросли длительное время. Русский физиолог растений А.С.Фаминцын (1871) из Санкт-Петербурга, один из основателей этой дисциплины в России, сделал первую попытку выращивать водоросли с использованием растворов нескольких неорганических солей. Он выращивал несколько видов зеленых водорослей, особенно два вида, которые он определил как *Chlorococcum infusionum* (Schrank) Meneghini и *Protococcus viridis* C. Agardh. Растворы, которые он использовал, были изменены Кнопом в 1865 году для изучения сосудистых растений. Рецепт этой среды можно найти в работе Г. Болда (G.Bold) (1942) (Preisig, Andersen, 2005).

Первые сведения о чистых (аксеничных) культурах водорослей можно найти в трудах датского микробиолога Мартинуса Бейеринка (M.Beijerinck) (1890) (фото 1a), хотя позднее Георг Клебс (G.Klebs) (1890) усомнился в этом достижении. М.Бейеринк усовершенствовал бактериологический метод Р.Коха, предложенный им 10 лет назад, и в своих опытах стал использовать воду из пробы и среду с желатином.

М.Бейеринк (1890, 1893) был первым исследователем, выделившим свободноживущие виды *Chlorella* и *Scenedesmus* в якобы свободные от бактерий культуры, и он также успешно выделил симбиотическую зеленую водоросль из *Hydra* («*Zoochlorella*») и лишайников (зеленая водоросль, которую он определил, как *Cystococcus humicola* Naegeli сейчас рассматривается как вид рода *Trebouxia*). Позднее он также получил якобы чистые культуры других водорослей, включая цианобактерии, и установил, что цианобактерии, такие как *Anabaena*, могут культивироваться в среде без азота (Preisig, Andersen, 2005).

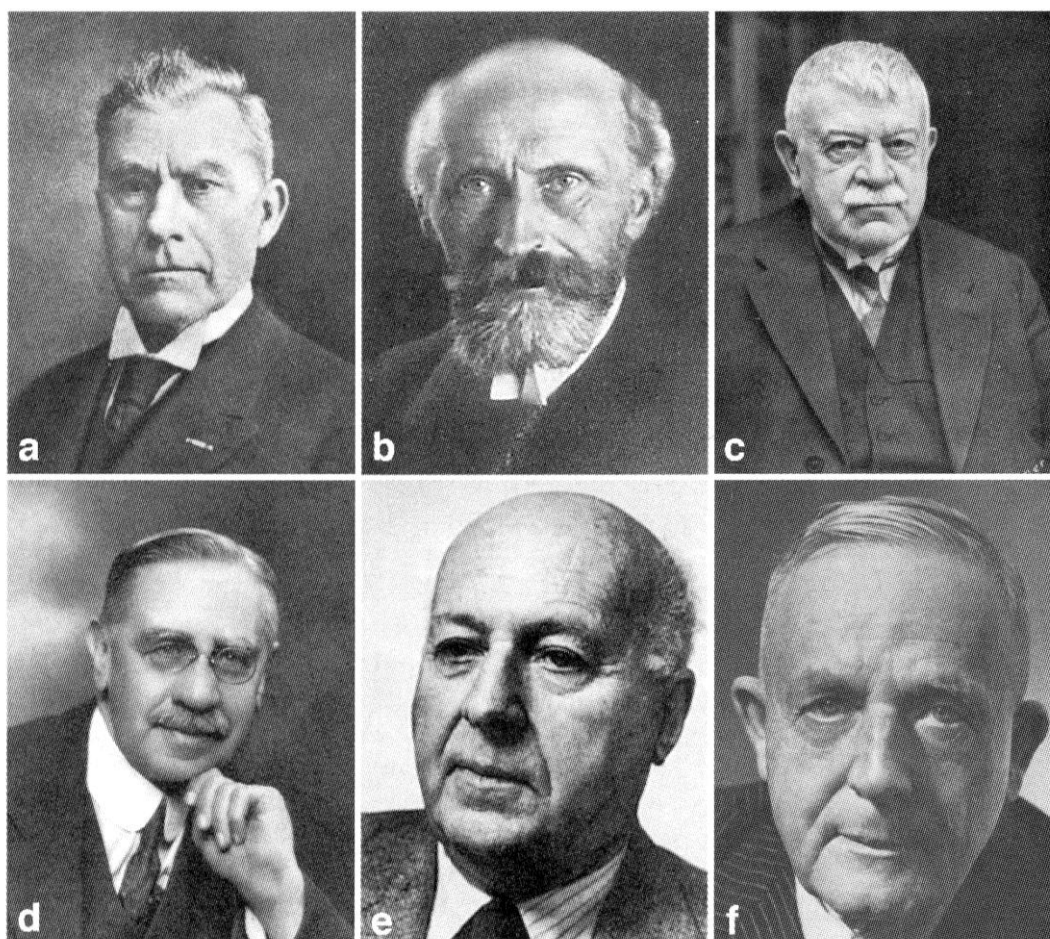


Фото.1: а - Мартинус Уильям Бейеринк (Martinus Willem Beijerinck) (1851-1931); b - Георг Клебс (Georg Klebs) (1857-1918); c - Robert Chodat (Роберт Шодати) (1865-1934); d - Edgar Johnson Allen (Эдгар Джонсон Аллен) (1866-1942); e - Ernst Georg Pringsheim (Эрнст Георг Прингшейм) (1881-1970); f - Otto Heinrich Warburg (Отто Генрих Варбург) (1883-1970) (Preisig, Anderson, 2005).

Исследования, равноценные по значимости работам М.Бейеринка для зеленых водорослей, были проведены П.Миквелом (P.Miquel) в Париже в Обсерватории Монтессори для диатомовых водорослей. П.Миквел,

микробиолог, который также является великим первооткрывателем в сфере аэробологии (Comtois, 1997), был первым исследователем, получившим чистые (аксеничные) культуры пресноводных и морских диатомовых водорослей. Кроме того, он разработал несколько новых методов, таких как использование микропипеток для выделения клеток водорослей и органической мацерации в качестве источника органических добавок в минеральную среду (добавление органических питательных материалов в форме отрубей, соломы, травы, мхов и т.д.). С помощью микропипеток и микроскопа он выделял отдельные клетки и помещал их в отдельные сосуды, содержащие питательную среду. П.Миквел также использовал метод разведения: он добавлял образец, содержащий диатомеи в подготовленную воду (питательную среду), и потом разделял эту смесь на ряд пробирок. П.Миквел предложил два раствора (А и В), содержащих минеральные соли, которые он использовал для обогащения морской воды. Позднее его знаменитые растворы А и В широко использовались для выращивания водорослей (Provasoli et al., 1957). Методика получения чистых культур диатомовых водорослей также была описана Л.Мачиатти (L. Macchiati) в Италии (Preisig, Andersen, 2005).

Немецкие исследователи Ф.Нолл (E. Noll) и Ф.Олтманнс (F. Oltmanns) еще в 1892 году опубликовали работы, обсуждающие культивирование морских водорослей, но они занимались скорее поддержанием жизнеспособности водорослей в благоприятных условиях, чем выделением чистых культур или осуществлением роста и размножения. Ботаник Ц.Нейджел (C. Naegeli), швейцарец по происхождению, в 1893 году установил, что медь оказывает сильное негативное воздействие на рост пресноводных водорослей. Он использовал водоросли рода *Spirogyra* для тестирования качества воды, используемой для культивирования. В Германии В.Крюгер (W. Krüger) в 1894 году смог получить чистые культуры бесцветных и сахарофильных коккоидных зеленых водорослей (*Prototheca*, *Chlorella* spp.). Х.Молиш (H. Molish) в 1895-96 гг. в Германском Университете в Праге и В.Бенеке (W. Bencke) в 1898 году в Университете Страсбурга (Страсбург) проводили эксперименты по изучению потребностей водорослей в минеральных добавках. Р.Булхак (R. Bouilliac) во Франции использовал органическую среду для выращивания цианобактерии *Nostoc*.

Но, возможно, наиболее важными исследованиями в области культивирования водорослей были опыты, поставленные Г.Клебсом (фото 1b) в Университете Базеля (Швейцария) (с 1898 года в Галле ан дер Саале и позднее в Гейдельберге, Германия). Он пытался получить аксеничные культуры нитчатых и сифональных водорослей, помещая выделенные зооспоры внутрь агара. Г.Клебс достиг успеха в выращивании водорослей, однако не смог получить бактериологически чистые культуры. Он использовал чашки Петри для культивирования, и был первым, кто выделил во-

доросли на агаре. Желатин, применявшийся в ранних микробиологических исследованиях, не подходил для этого, так как бактерии переваривали желатин, превращая твердый субстрат в жидкость (Preisig, Andersen, 2005).

Агар также использовался Н.Тишуткиным (1897) в Белоруссии, который впервые приписал себе получение чистой культуры цианобактерий, но чистота его культур всегда вызывала сомнения (Harder, 1917). Х.Вард (Ward, 1899) в 1899 году в Кембридже рекомендовал разбухший агар с растворенной уксусной кислотой с последующим полным ополаскиванием для смыва всех солей (Bold, 1942). Х.Вард также описал несколько методов выделения водорослей. Первый способ был основан на смешивании агара с раствором, обогащенным питательными веществами. Стерильный раствор разливался внутрь чашки, где он позже затвердевал. В этом случае некоторые выносливые водоросли начинали прорастать. Второй способ заключался в смешивании водорослей с раствором, обогащенным азотсодержащими соединениями и стерильным силикагелем. Подобным же образом он использовал большое количество известковой воды, в которую добавлялся газообразный диоксида углерода. Образующийся карбонат кальция затем разливался в чашки для культивирования и служил для ускорения роста водорослей. Х.Вард был первым ученым, использовавшим трафарет для создания узоров (образующихся в результате роста водорослей) на твердых субстратах. Для этого он накрывал чашки непрозрачной оболочкой, с прозрачной областью в форме буквы алфавита (например, А). Таким образом, свет освещал поверхность агара только сквозь прозрачную область в форме буквы. После некоторого периода времени, в освещенной области наблюдался рост водоросли. Когда оболочку убирали, едва заметная зеленая буква алфавита была видна на агаре (Preisig, Andersen, 2005).

1.2. Культивирование водорослей в XX веке

1.2.1. Обычное культивирование водорослей

В 1900 году Х.Зумстейн (H.Zumstein), студент Г.Клебса и В.Бенеке в Базеле, получил бактериологически чистую культуру *Euglena gracilis* Klebs. Он изолировал отдельные клетки с помощью капиллярной пипетки, а для устранения загрязняющих бактерий он сделал среду максимально кислой, но не губительной для водорослей. Исследования Р.Шодата (R. Chodat) (фото 1 с) и его коллег в Женеве были важны для расширения знаний о культивировании водорослей. Однако условия культивирования Р.Шодата часто очень сильно отличались от естественных, и он обнаружил появление морфологических изменений в клетках. В течение более чем 30-летних исследований он выделил более 300 видов водорослей в чистые культуры (Chodat, 1928). В 1903 году О.Рихтер (O. Richter), родившийся в Праге австрийский ботаник, продолжил работы П.Миквела по выращиванию аксе-

нических культур диатомовых водорослей. О.Рихтер также расширил исследования по изучению других водорослей, и в 1911 году он представил свою детальную публикацию, обобщившую все предыдущие работы по питанию водорослей (Richter, 1913). В 1903 году в Соединенных Штатах Г.Мур (Moore, 1903) опубликовал резюме о культивировании водорослей. В этом же году в Великобритании Гариетт Чик (Chick, 1903) представила свою работу о *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Она получила чистые аксенические культуры, которые многократно проверяла и пришла к заключению, что водоросль предпочитает азот в виде солей аммония. В Германии Э.Кустер (Küster, 1907) опубликовал пособие по культивированию водорослей. В 1908 году Кустер предпринял успешную попытку вырастить динофлагелляты, хотя ему не удалось получить чистую культуру бесцветного морского вида, который он предварительно описал как *Gymnodinium fucorum* Küster.

Х.Якобсен (Jacobsen, 1910), возможно, был первым, кто в 1910 году выделил бесцветную жгутиковую водоросль *Polytoma uvella* Ehrenberg. Он также был основоположником работ в выделении водорослей родов *Cartesia*, *Chlamydomonas*, *Chlorogonium* и *Spondylomorom* (Chlorophyceae). Для органического обогащения он использовал различные сахара и пептон. Шарлотта Тернец (C.Ternetz) в 1912 году продолжила исследования Х.Зумстейна (H.Zumstein), начатые еще в 1900 году в Базеле, которые были посвящены изучению органического питания *Euglena gracilis*. Она обнаружила, что зеленые формы этих организмов становятся бесцветными при выращивании в темноте, но снова приобретают зеленую окраску на свету. С другой стороны, при этом существовали постоянно бесцветные, но менее жизнеспособные формы *Euglena gracilis* (Preisig, Andersen, 2005).

В 1910 году Э.Аллен (E.Allen, 1910) (фото 1.d), директор Морской Биологической Ассоциации Соединенного Королевства, и его коллега Э.Нельсон (D.Nelson) внесли существенный вклад в развитие культивирования водорослей, включая самые ранние попытки выращивать водоросли в качестве корма для морских животных. Они выделяли и выращивали *Chaetoceros*, *Skeletonema* и *Thalassiosira* для питания морских беспозвоночных. Э.Аллен и Э.Нельсон создали искусственную морскую воду, используя различные концентрации солей. Кроме того, они установили важность железа как микроэлемента. Однако они добились хорошего роста водорослей только путем добавления небольшого количества естественной морской воды (менее 1-4%) к искусственно созданной. Э.Аллен в 1914 году отмечал (Allen, 1914), что этот эффект может быть следствием воздействия продуктов метаболизма бактерий и предположил, что органические микронутриенты так же важны, как и витамины, которые были только что открыты Казимиром Функом (Preisig, Andersen, 2005).

Так как Э.Аллен и Э.Нельсон выращивали массовые культуры водорослей не только в пробирках и колбах, они столкнулись с новыми

проблемами. Они быстро осознали, что в больших сосудах для культивирования лимитирующим фактором является свет, и до сих пор лимитирующее действие света продолжает оставаться главной проблемой в массовом культивировании водорослей. В связи с потребностями в большом объеме культур, они перестали использовать искусственную морскую воду и впоследствии стали использовать только обогащенную естественную морскую воду. Они установили, что вода в гавани («резервуарная вода») была загрязнена, а морская вода из Английского Канала («внешняя вода») была намного чище. Для очистки больших объемов морской воды, они кипятили её с последующим очищением древесным углем и пероксидом водорода. Исследователи даже пытались озонировать морскую воду, сообщая о небольшом успехе с использованием «несовершенного аппарата». Они предположили, что «промывка» раствора, проводимая П.Миквелом, могла бы быть «защитной» процедурой, при которой смывались или обезвреживались опасные субстанции (например, токсины). Подобное происходило при использовании древесного угля (содержащего большое количество кальция и фосфата магния) и пероксида водорода, которые оказывали подобный защитный эффект. Э.Аллен и Э.Нельсон установили, что нитрат калия был первоначально важным «питательным» ингредиентом в растворе Миквелла и обнаружили, что в некоторых случаях требовалось добавление фосфата.

Эти выдающиеся исследователи выращивали много диатомовых водорослей на «Морской воде Миквелла». Эта среда также поддерживала рост нескольких видов неуставленных видов красных водорослей, цианобактерий, зеленых водорослей (например, *Enteromorpha*), *Vaucheria* (Xanthophyceae), и даже молодых растений *Laminaria* (Phaeophyceae). Эти наблюдения подвели Г.Дрю (Drew, 1910) к проведению экспериментов по искусственному культивированию *Laminaria digitata* (Hudson) Lamouroux и к открытию ранних стадий их жизненного цикла. Таким образом, Э.Аллена можно считать основоположником марикультуры водорослей, впервые использовавшим водоросли для корма морских животных и заложившим основы культивирования водорослей.

Хотя Г.Дрю (Drew, 1910) смог культивировать *Laminaria*, он не обратил внимания на то, что водоросль имеет микроскопический гаметофит, и что макроскопическое растение является спорофитом. Первое открытие гетероморфного жизненного цикла у бурых водорослей было сделано несколькими годами позже С.Саважем (Sauvageau, 1915) во Франции, который культивировал *Sacchorhiza bulbosa* J.Agardh (другой вид порядка *Laminariales*). Это очень важное открытие С.Саважа привело к повышенному вниманию многих исследователей к проблеме культивирования бурых водорослей. Стало очевидным, что циклы развития многих водорослей этой группы невозможно установить без лабораторного культивирования.

В 1912 году Э.Прингшейм (E.Pringsheim) (фото1e), в то время работавший в Халле ан дер Саале (Германия), опубликовал первую часть своей монографии о методах культивирования водорослей (после многочисленных дополнений в течение долгого периода времени вплоть до 1970 года, его книга «Чистые культуры водорослей» 1946 года (Pringsheim, 1946) и ее перевод на немецкий в 1954 году были очень популярны). В работе 1912 года Э.Прингшейм (Pringsheim, 1912) показал, что хлор в водопроводной воде вреден для выращивания пресноводных водорослей. Вместо водопроводной или ключевой воды он использовал дистиллированную воду, полученную с помощью стеклянного дистиллятора. Было доказано, что дистиллированная вода, полученная с помощью металлического аппарата, является практически непригодной. Э.Прингшейм также усовершенствовал методику изоляции отдельных клеток или нитей с помощью капиллярной пипетки для уменьшения бактериального загрязнения. В этом же году он начал использовать почвенную вытяжку и позднее торф как добавки в очищенные минеральные среды для улучшения роста. С тех пор эти методики стали широко использоваться при культивировании водорослей.

Двухфазные культуры с пастеризованной почвой, покрытой водой, не только могли поддерживать лучший рост инокулированного материала, но также позволяли выращивать в культуре формы, не растущие на обычных средах. Установление того факта, что включение источников органического углерода в среды для культивирования способствует развитию бесцветных форм водорослей, привело к исследованиям гетеротрофии водорослей.

Согласно сведениям Р.Хардера (Harder, 1917), Э.Прингшейм был первым, кто смог получить аксеничные культуры цианобактерий. В 1921 году Э.Прингшейм установил, что ацетат является превосходным субстратом для гетеротрофного роста бактерий. Он показал, что различные виды Volvocales, Euglenophyceae, Cryptophyceae и диатомовые водоросли могут расти в темноте на ацетате, но не на глюкозе. С годами Э.Прингшейм создал большую коллекцию культур водорослей, сначала в Халле ан дер Саале, позднее в Германском Университете в Праге, которая к 1928 году включала почти 50 видов (к 1929 году более 100 видов). Позднее коллекция была перемещена в Кембридж и положила начало знаменитому Центру Культивирования Водорослей и Протозоа (CCAP). В 1953 году Э.Прингшейм покинул Кембридж и вновь уехал в Германию. Из взятых с собой субкультур он основал другую большую коллекцию водорослей - Коллекцию Культур Водорослей Геттингена (SAG). В целом, Э.Прингшейму удалось выделить приблизительно 2000 культур, представляющих 400 видов водорослей.

Отто Варбург (Warburg, 1919) (фото1f), прославленный физиолог и биохимик, живший в Берлине, установил, что быстрорастущие зеленые водоросли, такие, как *Chlorella*, являются идеальными эксперимен-

тальными объектами в биохимических и физиологических исследованиях и использовал эти культуры в своих работах по изучению процесса фотосинтеза. Он обогащал жидкие питательные среды воздухом, насыщенным диоксидом углерода, и применял искусственные источники света, состоящие из лампы в 300Вт в стеклянном стакане с холодной водой, который служил экраном, абсорбирующим инфракрасное излучение.

Похожий искусственный источник света был описан М.Хартманом (M.Hartmann). Подобные лампы он использовал в своих успешных экспериментах по культивированию вольвоксовых водорослей (например, *Eudorina*, *Gonium*), которые ранее рассматривались как наиболее трудно культивируемые (Hartmann, 1924). Первыми исследователями, получившими чистые культуры *Volvox*, были русские ученые Е.Успенский и В.Успенская (Uspenski, Uspenskaja, 1925). Они использовали среду, содержащую смесь минеральных солей, включая железо, с добавлением цитрата для предотвращения его осаждения. Позже в Берлине Ф. Веттштейн (F.Wettstein) смог получить одновидовые, но не аксеничные культуры нескольких групп флагеллят, не культивируемых ранее (*Cryptomonas*, *Synura*, *Uroglena*), выращивая их на агаре, содержащем экстракт торфа.

Андрей Львов (A.Lwoff) (фото 2 а), работавший в Институте Пастера в Париже, был современником Прингшейма. А.Львов больше интересовался простотой, грибами, бактериями и вирусами, однако он сделал несколько дополнений в знания о росте водорослей с использованием органических соединений, особенно аминокислот. Свои идеи он опубликовал в целом ряде сводок о методике культивирования микроорганизмов (Lwoff, 1923, 1929, 1932). Изучение потребностей некоторых водорослей в специфических органических соединениях послужили толчком для исследований М.Друпа (M.Droop) и открытия убихинона для роста динофлагелляты *Oxyrrhis marina* Dujardin (Drop, Doyle, 1966).

Э.Шрайбер (Schreiber, 1927), который работал в Варбурге и Берлине, разработал специальную комбинацию питательных веществ для культивирования вольвоксовых пресноводных водорослей и для морского фитопланктона. Его знаменитая среда, состоящая из смеси нитрата и фосфата, была основана на минимуме потребностей в двух элементах, необходимых для культур диатомовых водорослей. Д.Хаммерлинг (J.Hämmerling), студент М.Хартмана, расширил эти исследования путем добавления почвенной вытяжки в среду Шрайбера для выращивания зеленой водоросли *Acetabularia*. Эта «почвенная среда Шрайбера» в течение многих лет успешно использовалась для выращивания как одноклеточных, так и бентосных морских водорослей, которые не могли расти на других средах (Føyn, 1934).



Фото 2: а - Андрей Львов (André Lwoff) (1902-1994); б - Ульям Вишер (Wilhelm Vischer) (1890-1960); с - Харольд Чальз Болд (Harold Charles Bold) (1909-1987); d - Луиджи Провасоли (Luigi Provasoli) (1908-1992); е - Ричард Катрон Старр (Richard Cawthron Starr) (1924-1998); f - Хироши Тамия (Hiroshi Tamiya) (1903-1984) (Preisig, Anderson, 2005).

Ф.Майнкс (F.Mainx), сотрудник Э.Прингшейма в Германском Университете в Праге, также внес большой вклад в знания о культивировании водорослей. Он предложил метод центрифугирования для изоляции водорослей и был одним из первых исследователей, использовавших фототаксис подвижных стадий для получения чистых культур. С.Скиннер в Университете Миннесоты модифицировал метод Бристоль-Роач в новую методику выделения водорослей с использованием агара, основанную на методе разведения (Skinner, 1932). Он готовил серию из нескольких питательных агаровых тест-пробирок, которые затем охлаждались до застывания агара. В первую пробирку он вносил несколько капель суспензии почвы и воды и многократно встряхивал пробирку. Затем он помещал небольшое количество суспензии из первой пробирки и помещал во вторую. Этот процесс повторялся более 10 раз. После инкубации он разбивал стеклянную тест-пробирку и помещал цилиндрический кусочек агара на стериль-

ную бумагу. С.Скинер многократно ломал (не резал!) агар и с помощью маленькой лупы и препаровальной иглы снимал небольшие колонии водорослей, растущие на поверхности агара. Колонии, представляющие собой потомство отдельных клеток, вносились в жидкую среду, выращивались и потом снова помещались на застывший агар. После второй серии разрушения тест-пробирки и выделения колоний из одиночных клеток он установил, что приблизительно половина колоний водорослей были аксеничными.

У.Вишер (фото 2b), ранее работавший с Р.Шодати, был выдающимся специалистом в области культивирования наземных водорослей, особенно групп *Chlorophyceae* и *Heterocontae* (*Xanthophyceae/Eustigmatophyceae*) (Vischer, 1926, 1937, 1960). В 1975 году его большая коллекция культур в Университете Базеля (Швейцария), включающая многие типовые штаммы, была перенесена в коллекцию культур ASIB в Инсбруке (Австрия), где она остается до сих пор и составляет большую часть настоящей коллекции (Gärtner, 2004).

Трое из самых видных фикологов последнего века – Гейтлер в Вене (Австрия), Корнманн в Хелголанде (Германия) и вон Стош в Магдебурге (Германия) – при исследовании культур водорослей основной акцент уделяли жизненным циклам и систематике. Их наиболее активная научная карьера началась в 1920-х (Гейтлер) и в 1930-х годах (Корнманн и вон Стош) и продолжалась до 1980-х годов (Garbary, Wynne, 1996).

В Соединенных Штатах Харольд Болд (фото 2c) разработал собственные методы культивирования (Bold, 1936, 1942, 1974) и внес неоценимый вклад в изучение микроскопических водорослей. Его знаменитый обзор «Культивирование водорослей» (1942) стал новым словом в фикологии.

С.Чу (S.Chu), который прибыл в Великобританию из Китая в 1938 году и сначала работал вместе с Фричем в Лондоне и позднее в Милпорте и Плимуте (в 1945 году он уехал в Америку и потом вернулся обратно в Китай), также был пионером среди тех, кто изобретал питательные среды, имеющие сходство с субстратами, на которых растут водоросли в естественных условиях. Его очень успешная среда Чу-10 была сходна по составу солей и концентрации с водой из эвтрофных озер (Chu, 1942).

Л.Провасоли (фото 2d), сначала в Италии (Provasoli, 1937/38), позднее в Соединенных Штатах, вместе с С.Хатнером, И.Пинтнером и другими коллегами (Hutner et al., 1950; Provasoli, Pintner, 1953) занимался проблемой создания искусственных сред для культивирования водорослей в течение более чем 40 лет (в 1930-80-х годах). Он и его коллеги были одними из первых исследователей, использовавших антибиотики для получения бактериологически чистых культур (Provasoli et al., 1948). Хотя потребность в витаминах была известна ранее, они провели всесторонние исследования для определения потребности в витаминах для большого числа

водорослей (Provasoli, 1958б). Включение витаминов и органических экстрактов в морские среды значительно увеличивало количество водорослей, выращиваемых аксенично. Другим нововведением, которое сделало среду Провасоли такой успешной, было добавление ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), метаболически инертного хелатора, заменяющего органические хелаторы, такие как цитрат (Hutner et al., 1950). ЭДТА позволяла обогащенным искусственным средам и морской воде дольше сохранять свойства среды, по сравнению со средами с добавлением почвенного экстракта (Provasoli et al., 1954; Provasoli et al., 1957; Provasoli, 1958б).

Необходимость добавления микроэлементов была кратко обобщена Л.Провасоли и И.Пинтнером (Provasoli, Pintner, 1960), которые объяснили, почему сначала в среду было необходимо добавлять только железо, а потом – кобальт, медь, марганец, молибден, ванадий и цинк. Они отмечали, что в результате промышленных методов очистки «химически чистые» соли подвергаются многим изменениям, что приводит к появлению постоянно изменяющихся примесей. Другим новшеством Л.Провасоли было использование физиологически инертного рН буфера и применение глицерофосфата натрия в качестве растворимого источника фосфора, что предотвращало осаждение железа. Л.Провасоли был первым, кто смог получить аксеническую культуру зеленой ветвящейся водоросли *Ulva*. Он обнаружил, что в культуре при отсутствии бактерий для нормального развития тела водоросли необходимы растительные гормоны (Provasoli, 1958а). Наследие Провасоли существует в виде его большой коллекции морских водорослей, которые были присоединены к коллекции Роберта Джулиарда и сейчас существуют в составе Национального Центра Культивирования Морского Фитопланктона Провасоли-Джулиарда (CCMP) в Лаборатории Океанических наук Бигелоу в Мейне.

Открытие пенициллина, стрептомицина и других антибиотиков привело к их широкому использованию против бактерий в культурах водорослей. Л.Провасоли с соавторами (Provasoli et al., 1948), работая над получением аксеничных штаммов с применением антибиотиков, обнаружили, что стрептомицин может использоваться для получения бесцветных мутантов *Euglena*. Ранние сообщения о получении аксеничных культур с использованием антибиотиков включают данные М.Голдзвейг-Шелубски (M.Goldzweig-Shelubsky), который получил бактериологически чистые культуры *Scenedesmus*, *Navicula*, *Euglena* в результате обработки пенициллином; С.Спенсера (S.Spencer), который смог очистить *Phaeodactylum*; К.Рейча (K.Reich) и Д.Кана (J.Kahn) о получении аксеничной культуры *Prymnesium parvum* Carter; М.Друпа (M.Droop) о разработке метода для очистки водорослей с применением антибиотиков (Preisig, Andersen, 2005).

Р.Старр (R.Starr) (фото 2 е), студент Х.Болда, в 1953 году начал создавать коллекцию культур в Университете Индианы, которую в 1976 году перевез в Техасский Университет в Остине (Коллекция культур водорос-

лей UTEX) (Starr, Zeikus, 1993). Сначала она содержала преимущественно штаммы зеленых водорослей (особенно Volvocales, Chlorococcales, Desmidiaceales), которые он использовал для своих исследований, а также 200 штаммов, которые он получил от Э.Прингшейма. Эта коллекция затем была значительно расширена (в 1976 году она насчитывала 2000 штаммов), и сейчас она состоит примерно из 2300 штаммов (относящихся приблизительно к 200 различным родам), представляющих одно из крупнейших и разнообразных собраний живых водорослей на Земле.

1.2.2. Массовое культивирование микроводорослей

Кроме достижений Э.Аллена и Э.Нельсона (Allen, Nelson, 1910), которые выращивали водоросли для сельского хозяйства, ученые развивали новые методы массового производства водорослей для других целей. Первые работы по выращиванию микроводорослей (особенно *Chlorella*) на твердых культурах проводились О.Варбургом (O.Warburg) в Берлине. В Институте Океанографии Вудс Хоул (Woods Hole Oceanographic Institution) в США Б.Кетчум (B.Ketchum) и А.Редфилд (A.Redfield) описали методику поддержания непрерывных культур морских диатомовых водорослей в больших объемах для химических анализов. Процедура включает периодический сбор урожая из установленной части (на килограмм или более сухого материала) в критический момент кривой роста, пока оставшаяся популяция продолжает размножаться и расти до сбора нового урожая. С помощью этой методики Б.Кетчум также добился роста и оптимального урожая клеток и других одноклеточных водорослей. Этот полунепрерывный метод культивирования до сих пор используется в сельском хозяйстве как средство быстрой продукции фитопланктона для корма морских животных. В Геттингеме (Германия) Р.Хардер (R.Harder) и Х.Уич (H.Witsch) также начали эксперименты по массовому культивированию диатомовых для определения возможности получения жиров из этих культур (Preisig, Andersen, 2005).

Большой аппарат для выращивания *Chlorella* в непрерывных культурах был создан Д.Майерсом (J.Myers) и Л.Кларком (L.Clark) в Техасском Университете в Остине. Они изобрели его для поддержания своих культур в определенной точке кривой роста путем разбавления раствора, контролируемого фотометрической системой. В оригинале эта установка представляла собой вертикальную камеру в форме рукава, освещенную вертикальной трубчатой лампой таким образом, чтобы эффективное освещение не зависело от общего объема раствора. Клетки собирались вручную через определенные интервалы, при этом оставляли небольшой объем раствора для инокулята.

Микроводоросли, такие как *Chlorella*, рассматривались как потенциальные объекты для коммерческого использования (например, для получе-

ния продовольствия) Х.Споером (H.Spoehr) и Х.Милнером (H.Milner) из Института Карнеги Стенфордского Университета в Калифорнии. Дальнейшие исследования по применению лабораторных методов для непрерывного промышленного культивирования хлореллы проводились П.Куком (P.Cook) в Стенфордском Исследовательском Институте, который построил небольшой пилотный (экспериментальный) завод. Заинтересованность в продолжении массового культивирования водорослей проявил Институт Карнеги через контракт с Артуром Д.Литтлом и компанией из Кембриджа (Массачусетс), который создал и запустил несколько заводов, расположенных на крыше промышленного здания (Burlew, 1953). Краткосрочные урожаи хлореллы составляли $11\text{г сухого веса}\times\text{м}^{-2}\times\text{день}^{-1}$. Было сделано заключение, что урожая до $20\text{-}25\text{г сухого веса}\times\text{м}^{-2}\times\text{день}^{-1}$ можно достичь только за счет улучшения технологии и культивирования в более подходящих географических условиях.

В конце 1940-х и в начале 1950-х годов важные работы по промышленному производству хлореллы проводились в Германии Х.Витшем (H.Witsch). Ф.Гуммерт с коллегами (F.Gummert) начал исследовательскую программу по крупномасштабному производству в оранжереях и на открытом воздухе в Эссене.

Примерно в это же время другая серия лабораторий и пилотных заводов по выращиванию хлореллы была запущена в Японии под руководством Х.Тамия (H.Tamiya) (фото2f) в Институте Токугайа в Токио. Эта же группа ученых добилась успехов в интродукции методики синхронизации культур. Синхронизация, экспериментально достигнутая координация индивидуальных жизненных циклов в популяции клеток, была большим прогрессом для экспериментальной работы в физиологии водорослей и впоследствии использовалась для модификации других методик (Tamiya, 1966).

Результаты первого всплеска массового культивирования микроводорослей были опубликованы в сводке под редакцией Дж.Бурлеу (Burlew, 1953). Более поздние данные о культивировании микроводорослей представлены в работе К.Соедера (Soeder, 1986).

1.2.3. Культивирование морских водорослей

Вплоть до 1950-х годов почти все морские водоросли, используемые в промышленных отраслях, собирались только из естественных местообитаний. *Porphyra* (красная водоросль), известная как «нории» в Японии, «зицаи» в Китае и «лавер» на западе, является единственной водорослью, имеющей долгую историю культивирования. Это наиболее часто употребляемая в пищу макроводоросль, произрастающая в прибрежных к юго-восточной Азии районах Тихого океана, первые упоминания о ее культивировании относятся к XVII веку (Preisig, Andersen, 2005). Повышение

природных запасов первоначально достигалось путем помещения ветвей деревьев или безлистных побегов бамбука на дно моря или очищением поверхности скал, которые служили местом для прикрепления этих водорослей. С конца 1920-х годов сети с крупными ячейками (сначала изготавливаемые из волокон кокоса, но потом замененные на сети из других материалов) натягивали горизонтально между рядами бамбука. Эти сети можно было легко перенести с поверхности земли на место культивирования, позже этот способ стал основным в производстве нори в Японии. В 1949 году британский ботаник Кетлин М.Дрю исследовала полный жизненный цикл порфиры, в частности и микроскопические стадии, что привело к пересмотру методик культивирования и инициировало быстрое развитие производства порфиры с 1960-х годов (Garbary, Wynne, 1996). Дальнейшее развитие способов культивирования порфиры и других морских водорослей было подробно описано С.Ценгом (Tseng, 1981).

1.2.4. Криопрезервация

Криобиология получила толчок для своего развития только в 1949 году, когда было обнаружено, что глицерин предохраняет сперматозоиды домашней птицы от повреждения при замораживании (Polge et al., 1949). Со времен этого открытия сохранение в жидком азоте стало стандартной методикой для длительного хранения водорослей, однако первые полные сводки о замораживании клеток водорослей были опубликованы только в начале 1960-х годов (Terumoto, 1961; Holm-Hansen, 1963).

Контрольные вопросы

1. Кто стоял у истоков культивирования водорослей?
2. Какой вклад в изучение водорослей внес М.Бейеринк?
3. Какие методы культивирования водорослей использовали в XIX веке?
4. Какой вклад в фикологию внесли П.Миквелл и Г.Клебс?
5. Чем характеризовалось культивирование водорослей в XX веке?
6. Какова роль Э.Прингшейма в создание коллекций водорослей?
7. Какой вклад в развитие культивирования водорослей внесли Х.Болд и его ученики?
8. Кто из наших соотечественников внес большой вклад в развитие фикологии?
9. Укажите способы массового культивирования морских водорослей.
10. Какова роль криопрезервации в современной фикологии?

ГЛАВА 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВОДОРΟΣЛЕЙ

2.1. Материалы

2.1.1. Химикаты

Химические реактивы, необходимые для приготовления питательных сред, должны быть самого высокого качества. Качество определяется изготовителем, и каждая фирма использует свою собственную маркировку для его обозначения. Для определения качества реактивов можно использовать каталоги компаний и информацию, размещенную на Интернет-сайтах. В последнее время установлено, что большинство солей и реагентов содержат следовые количества металлов и других загрязнителей, что может замедлять рост олиготрофных видов. К тому же, примеси тяжелых металлов в растворах солей могут приводить к увеличению номинальной концентрации солей в некоторых средах. В таких случаях необходима дополнительная очистка химикатов (Watanabe, 2005).

2.1.2. Оборудование

Определенный минимум оборудования (стеклянная и пластиковая посуда, аналитические весы с точностью до 1 мг, рН-метр и магнитная мешалка) необходим для приготовления растворов и питательных сред. Автоклав необходим для стерилизации. Оборудование для фильтрации (вакуумная установка или шприц для фильтрации, мембранные фильтры) используется для стерилизации субстанций, чувствительных к нагреванию. Ультразвуковая моечная машина полезна для очистки стеклянной и пластиковой посуды от устойчивых загрязнений. Холодильник с морозильной камерой нужен для хранения растворов и питательных сред (Watanabe, 2005).

2.1.3. Посуда

Разнообразная посуда (мензурки, различные колбы, бутылки, пробирки, ампулы, цилиндры, чашки Петри, лопаточки, трубочки, шприцы и бюретки) используется для приготовления питательных сред, включая доступную стеклянную посуду. Кроме того, многие из этих наименований посуды существуют и в виде одноразовой и многоразовой пластиковой, включая покрытый тефлоном пластик. Для поддержания культур водорослей широко используются пробирки с закручивающимися крышками и колбы Эрленмейера с силиконовыми крышками. Традици-

онные ватные пробки тоже применимы, однако они требуют определенного времени для приготовления. Силиконовые пробки могут использоваться многократно, и они обеспечивают лучший газообмен по сравнению с ватными пробками.

Существует огромное многообразие стеклянной посуды, однако не вся она пригодна для приготовления питательных сред и культивирования водорослей. Жаростойкая посуда из боросиликата, такая как Pyrex (Corning Co.Ltd.), DURAN (Shott Co.Ltd.) и HARIO (Hario Co.Ltd.), лучше всего подходит для приготовления растворов и питательных сред. Посуда из боросиликата не влияет на pH растворов и состав питательной среды и не подвергается быстрой коррозии.

Многие исследователи подчеркивают важность использования только химически чистой стеклянной посуды. Для этих целей могут использоваться различные чистящие реагенты. После очистки посуду необходимо промыть 1н. раствором HCl или HNO₃, затем водопроводной водой с последующим ополаскиванием дистиллированной водой. После этого посуда должна быть высушена. Хранят такую посуду с соблюдением правил стерильности.

Полиэтиленовая, поликарбонатная или покрытая тефлоном посуда может использоваться вместо стеклянной посуды для хранения растворов отдельных следовых металлов, комбинированных растворов металлов и растворов силикатов. Однако при этом небольшие количества металлов и кремниевые кислоты могут адсорбироваться и осаждаться на стенках бутылей. В результате этих реакций концентрация раствора будет изменяться, и конечная концентрация будет неизвестной (Watanabe, 2005).

2.1.4. Вода

Самые первые исследователи использовали ключевую воду, потому что талая и дистиллированная вода были сильно загрязнены металлами. Э.Прингсхейм (Pringsheim, 1912) предложил использовать стеклянный аппарат для дистилляции при культивировании водорослей, так как металлический делал воду слишком токсичной. Сегодня качественная вода получается путем перегонки в аппарате однократной или двойной дистилляции с кварцевым стеклянным конденсором или конденсором Pyrex, а также с деонизацией воды с дальнейшей очисткой угольными или мембранными фильтрами (например, Milli-Q, Millipore Corp.). Уровень качества определяется чувствительностью как водорослей, так и процедуры, потому что более точные экспериментальные исследования требуют более высокого качества воды (Watanabe, 2005).

2.1.5. Агар

Обычно агар состоит из агарозы и агаропектина, которые загрязнены различными примесями (Krieg, Gerhardt, 1981). Некоторые сорта агара содержат водорастворимые литические агенты против цианобактерий. Для большинства культивируемых водорослей основным требованием к агару является возможность его использования без дополнительной очистки. Для чувствительных водорослей требуется промывание агара для очистки от примесей (Waterbury et al., 1986). Существуют две методики промывания агара:

- нагреть и растворить двукратную концентрацию агара в деионизованной воде, затем охладить до застывания. Нарезать агар на кусочки и сполоснуть 1-2 раза в дистиллированной воде. Дистиллированная вода должна меняться ежедневно в течение 6-8 дней. Промытый агар с двукратной концентрацией и двукратный объем среды должны быть автоклавированы в разных посудах и смешаны после охлаждения до состояния геля;

- поместить порошковый агар в большую мензурку с двукратно дистиллированной водой (например, 100г в 3л воды) и перемешать в течение 30 минут (Waterbury et al., 1986). Дать агару осесть и вылить воду, повторить процедуру до полной очистки воды. Удалить воду (при необходимости профильтровать) и промыть агар 3л этанола. Разделить этанол и агар путем фильтрации (например, с помощью фильтра Whatman 4 и колонки Бохнера). Затем сполоснуть агар аналитически проверенным ацетоном. Удалить ацетон и высушить агар при температуре 50°C в течение 2-3 дней. Хранить агар в хорошо закрытом контейнере.

Возможно, что даже промытый агар останется загрязненным следовыми количествами компонентов, токсичных как для цианобактерий (Shirai et al., 1989), так и для других чувствительных водорослей. В этом случае можно использовать более дорогую, но более чистую агарозу для молекулярных исследований.

2.1.6. Почва

Жидкий почвенный экстракт или твердые частицы почвы используются для выращивания видов водорослей в том случае, если нет необходимости в точных знаниях о потребностях в питательных веществах и обязательным условием является поддержание нормальной морфологии. Успешность использования почвенной вытяжки зависит от выбора подходящей почвы (Почвенные водоросли, 1969). Однако найти хорошую почву не очень просто. Например, из более чем 40 различных видов почв для культивирования хризифитовых водорослей пригодными оказались только

две (Watanabe, 2005). В качестве хороших почв для культивирования водорослей можно рекомендовать почвы из садов и оранжерей, где они не обрабатывались химикатами (различными пестицидами), почвы из заповедных лесов и лугов, не подвергающихся выпасу (Starr, Zeikus, 1993; Tompkins et al., 1995). Почва должна быть суглинистого типа, почвы с большим содержанием глины не подходят. Также не подходит кислая почва, а также почва, взятая из глубоких горизонтов. Для некоторых редких или чувствительных водорослей иногда можно использовать хорошую почву около озер или водоемов, где они растут в естественных условиях. Однако почва должна быть отобрана над уровнем воды, поскольку ниже могут осаждаться различные токсиканты.

Удалив весь мусор (камни, листья, корни, черви), почву необходимо высушить при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре менее 60°C. После высушивания почва должна легко измельчаться до состояния пыли. Для измельчения почвы можно использовать чистые ступку и пестик. Далее измельченную почву необходимо просеять через сито для удаления всех крупных частиц. Хранить почву следует в сухой посуде.

Для приготовления почвенной вытяжки необходимо взять 1 часть почвы и 2 части дистиллированной воды, после перемешивания смесь воды и почвы необходимо пастеризовать в течение 2 часов (Tompkins et al., 1995). Необходимо дождаться осаждения всех частиц, после чего жидкость следует профильтровать (например, с использованием фильтра Whatman). Экстракт должен быть подвергнут пастеризации или автоклавированию еще раз. Раствор должен быть тщательно укупорен и храниться при температуре 4°C.

Существует еще один более сложный метод приготовления почвенной вытяжки с использованием щелочной экстракции. Подробное описание данного метода можно найти в статье Л.Провасоли с соавторами (Provasoli et al., 1957).

2.2. Маточные растворы

2.2.1. Общие комментарии

Среда в основном состоит из трех компонентов: макроэлементов, микроэлементов и витаминов, которые готовят как маточные растворы в количестве 100мл на 1л при концентрации питательных веществ, превышающей необходимую дозу в конечном растворе в 100 или 1000 раз. Для получения среды берут небольшое количество маточного раствора, например, всего 1мл. Использование маточных растворов дает целый ряд преимуществ:

- позволяет избежать ошибок при взвешивании маленьких количеств солей;

- однажды приготовив маточный раствор, можно многократно легко готовить питательную среду. Теоретически, если приготовить 1л маточного раствора и использовать 1 мл этого раствора для приготовления 1л питательной среды, то можно приготовить 1000л среды.

Методика приготовления маточных растворов заключается в следующем:

- добавить приблизительно 80-90% необходимого объема дистиллированной или деионизированной воды в мензурку;

- растворить необходимое количество взвешенного вещества при постоянном перемешивании. Если маточный раствор включает несколько компонентов (например, растворы микроэлементов), необходимо сначала полностью растворить первый компонент, и только после этого добавить следующий. Большинство компонентов среды легко растворяется при перемешивании, однако для быстрого растворения некоторых веществ необходимо нагревание или изменение pH среды;

- разбавить полученный раствор дистиллированной или деионизированной водой до необходимого объема.

Маточные растворы необходимо хранить в холодильнике при температуре +4°C в плотно закрытой стеклянной или пластиковой посуде для предотвращения изменения первоначальной концентрации в результате испарения.

Маточные растворы, содержащие субстраты, которые способствуют росту бактерий и грибов, должны быть подвергнуты стерилизации. Если маточные растворы имеют видимые признаки грибного или бактериального загрязнения, они должны быть приготовлены заново. Необходимо предохранять растворы от испарения воды. При испарении воды концентрация раствора может увеличиваться до неизвестных значений. Если необходимо провести точные эксперименты, лучше всего использовать свежие маточные растворы макро- и микроэлементов. Ниже приводятся практические протоколы для приготовления растворов макроэлементов, микроэлементов и витаминов (Watanabe, 2005).

2.2.2. Макроэлементы

Маточные растворы макроэлементов необходимо готовить по отдельности в виде сильно концентрированных растворов (см. 2.2.1.). Растворы фосфатов нельзя хранить в полиэтиленовых емкостях, так как фосфат ионы хорошо адсорбируются полиэтиленом (Hassenteufel et al., 1963). Растворы силикатов не следует хранить в стеклянной посуде, так как стекло может переходить в раствор. Для этих целей лучше использовать тефлоновую, полиэтиленовую или поликарбонатную посуду. Если необходи-

мо провести эксперимент без силикатов, маточные растворы следует хранить в стеклянной посуде.

2.2.3. Микроэлементы

Растворы микроэлементов обычно готовят в виде отдельных растворов или смешанных растворов. В некоторых случаях они добавляются непосредственно в раствор в концентрациях от 0,1мг до 20мг на литр. Во многих, но не во всех средах для пресноводных водорослей Na_2EDTA (динатриевая этилендиаминтетрауксусная кислота) используется в качестве хелатора. Когда используется EDTA, ее следует добавлять сразу же после добавления металлов. Практические рекомендации по последовательности приготовления растворов приводятся ниже (Watanabe, 2005).

2.2.3.1. Приготовление отдельных растворов

Отдельные (например, содержащие соли одного металла) растворы готовятся в концентрации, в 1000 раз превышающую концентрацию в конечном растворе. Рецепты маточных растворов для приготовления питательных сред приводятся в Приложении 1. Схема приготовления маточных растворов включает в себя два этапа:

- в дистиллированную или деионизированную воду (объемом примерно 800-950мл) добавляют необходимое количество микроэлементов. В случае растворения железа, кобальта, меди, марганца и цинка можно прокипятить раствор в течение 5-10 минут для ускорения процесса;
- раствор доводят до конечного объема (1л) путем добавления дистиллированной или деионизированной воды.

Растворы солей хранят в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ в пластиковой, плотно закрытой емкости для предотвращения испарения.

Когда необходимо приготовить раствор микроэлементов небольшой концентрации, необходимо приготовить маточный раствор, очень точно взвешивая соль. Затем нужно разбавить раствор до получения необходимой концентрации (Watanabe, 2005).

2.2.3.2. Смешанный маточный раствор (рабочий маточный раствор)

При приготовлении смешанного маточного раствора следует соблюдать следующую последовательность операций:

- в мензурку наливают приблизительно 80% необходимого объема дистиллированной или деионизированной воды (например, 800мл на 1 л раствора);
- если в качестве хелатора используется Na_2EDTA или другой хелатор, в первую очередь растворяют его;

– добавляют необходимый объем каждого микроэлемента из отдельного раствора, каждый раз хорошо перемешивая смешанный маточный раствор;

– доводят объем раствора до нужной величины дистиллированной или деионизированной водой и хранят его в холодильнике.

Для удобства лучше перелить маточные растворы в емкости маленького объема. Например, если для приготовления конечного раствора требуется 1мл маточного раствора, 1мл раствора можно поместить в эппендорф и заморозить, или же разлить раствор в склянки по 10мл (Watanabe, 2005).

2.2.4. Витамины

Для культивирования водорослей обычно используют три витамина – витамин B₁ (тиамин), витамин B₁₂ (цианокобаламин) и витамин H (биотин). Многие водоросли нуждаются только в одном или двух из этих витаминов, но внесение витаминов, в которых водоросли не нуждаются, не может причинить им никакого вреда (Provasoli, Carlucci, 1974). Кроме этих трех витаминов, в рецептах некоторых сред упоминаются и другие витамины. Например, для приготовления среды для культивирования *Phacotus lenticularis* (Ehrenberg) Stein необходимо добавление никотинамида (Schlegel et al., 2000).

Витамины подвергаются многократному автоклавированию вместе с конечной средой. Несомненно, это приводит к их разрушению, но даже в этом случае они сохраняют свою эффективность. Лучше всего добавлять асептические растворы витаминов в среду после автоклавирования.

2.2.4.1. Приготовление отдельных растворов витаминов

Для биотина и цианокабаламина необходимо готовить отдельные маточные растворы, и для удобства, особенно если требуется приготовить несколько сред с различным содержанием витаминов, необходимо приготовить первоначальный раствор тиамин×HCl. Концентрация маточного раствора должна превышать концентрацию конечного раствора в 100 - 10000 раз. Точные концентрации зависят от того, какое количество витамина должно содержаться в среде.

Маточные растворы витаминов должны быть стерилизованы с использованием фильтров и помещены в емкости маленького объема (например, 1-10мл эппендорфы или пробирки из поликарбоната) с соблюдением условий стерильности. В качестве альтернативы можно предложить следующий способ: первоначальный раствор может быть помещен в маленькие пробирки и затем автоклавирован как окисленный раствор (pH=4,5-5), но при этом следует помнить, что некоторые пластмассы тают в автоклаве, а стеклянные пробирки могут разбиться при замораживании (Watanabe, 2005).

2.2.4.2. Смешанный маточный раствор витаминов

Для приготовления смешанного раствора, который обычно содержит все витамины, необходимо растворить аликвоту (обычно 1мл) каждого отдельного маточного раствора в 100 или 1000мл дистиллированной или деионизированной воды. Конечный объем смешанного раствора может различаться в зависимости от необходимой концентрации того или иного витамина в растворе. Смешанный маточный раствор стерилизуется и помещается в маленькие емкости так, как было описано выше. Этот раствор лучше хранить в замороженном виде (Watanabe, 2005).

2.3. Общие методы приготовления питательных сред

Питательные среды для культивирования водорослей можно разделить на три группы: синтетические, обогащенные и почвенные вытяжки. Синтетические (искусственные) среды были созданы прежде всего для того, чтобы обеспечить культивирование водорослей как для экспериментальных исследований, так и для поддержания жизнеспособности штаммов. В качестве примеров можно привести среды Болда, Чу-10, BG-11, WC (см. Приложение 1). Эти среды могут быть как жидкими, так и агаризованными. При использовании питательных сред следует помнить, что дистиллированная и деионизированная вода, а также ультрачистые химикаты могут содержать следовые количества посторонних примесей, измеряемых нанограммами или пикограммами.

Обогащенные среды готовятся путем добавления питательных веществ к естественной озерной или проточной воде или обогащением синтетической среды раствором почвенной вытяжки, растительных экстрактов (например, торфяного мха), экстракта дрожжей и т.д. Обогащенные среды содержат неопределенные количества питательных веществ, так как озерная и проточная вода имеет множество органических и неорганических молекул, химический состав экстрактов тоже неизвестен. Вообще, обогащенные среды не используются для физиологических экспериментов, однако водоросли часто растут на них, сохраняя нормальную морфологию. Природная вода должна быть относительно чистой и не иметь загрязнения. Если природная вода содержит значительное количество органических примесей, это может вызвать интерференцию в молекулярно-биологических исследованиях, особенно когда нуклеиновые кислоты выделяются без промывания клеток. В качестве примера обогащенной среды можно привести среду Algo-Gro (Carolina Biological Supply Co.), среду для выращивания *Audouinella*, среды для диатомовых водорослей, среду VS, модифицированную среду для *Porphyridium*, среду Малта, среду для *Polytoma* (Andersen et al., 2005).

Почвенную вытяжку готовят добавлением 1-2см высушенной и просеянной садовой почвы на дно склянки с водой. Вытяжка подобна озеру или пруду, где питательные вещества постоянно циркулируют из донных отложений в верхние слои воды благодаря жизнедеятельности бактерий и перемешиванию воды. В почвенной вытяжке диффузия, также как и биохимическая активность бактерий (ксеничные культуры) и водорослей на границе почвы и воды, имитируют естественные условия. Состав почвенной вытяжки зависит от почвы (например, pH, питательные вещества, органические буферы, витамины), и поэтому очень важно найти хорошую и в то же время соответствующую почву. Водоросли, растущие на почвенной вытяжке, обычно имеют нормальную морфологию, и эти культуры можно поддерживать длительное время (Watanabe, 2005).

2.3.1. Синтетические среды

От качества приготовленной синтетической среды в значительной мере будет зависеть характер и интенсивность роста водорослей. Синтетические среды готовят следующим образом:

- добавляют приблизительно 80-90% необходимого объема воды в мензурку;
- если требуется буфер, вносят необходимое количество взвешенного буфера (например, трис-глицилглицина, HEPES, TAPS, Bicine, MES), постоянно перемешивая раствор;
- в зависимости от состава раствора добавляют необходимые питательные вещества из предварительно приготовленных маточных растворов или взвешенное количество веществ при постоянном перемешивании;
- доводят раствор до необходимого объема дистиллированной водой;
- при необходимости регулируют pH раствора путем добавления либо 1н. раствора NaCl, либо 1н. раствора NaOH (если в среде отсутствует буфер);
- приготовленную среду переливают в емкость для культивирования, например, по 10мл в пробирки. Далее пробирки со средой автоклавируют или стерилизуют с помощью фильтра;
- после стерилизации автоклавированием среду охлаждают и дают ей отстояться в течение 24 часов для восстановления равновесия неорганических углеродных компонентов. В случае использования колб большого объема необходимо провести аэрацию для ускорения восстановления равновесия (Watanabe, 2005).

2.3.2. Обогащенные среды

При приготовлении обогащенной среды добавляют приблизительно 80-90% от требуемого объема дистиллированной или природной воды в мензурку.

Если используется природная вода, ее необходимо взять из того источника, где ранее были отобраны пробы водорослей. После чего эту во-

ду автоклавируют или пастеризуют. В данном случае можно использовать другой способ стерилизации – фильтрацию, при этом используют фильтры с размером пор 0,22μм. Однако следует отметить то, что эта процедура не позволяет обезвредить вирусы.

Далее в воде растворяют каждый компонент (из маточного раствора или взвешенное количество): макроэлементы, микроэлементы, витамины, экстракты или органические вещества (например, экстракт дрожжей, солода, торфяного мха или почвы). Раствор с питательными веществами доводят до необходимого объема, доливая в колбу дистиллированную или природную воду соответственно.

Важное значение для развития водорослей имеет pH среды. Большинство водорослей предпочитают нейтральную или слабощелочную реакцию, равную 7,0-7,6. Исключение представляют водоросли дистрофных водоемов и торфяных болот. Поэтому, по возможности, так же как и при приготовлении синтетических сред, необходимо отрегулировать pH раствора.

Затем среду переливают в емкость для культивирования, которую потом автоклавируют или стерилизуют с помощью фильтра (Watanabe, 2005).

2.3.3. Почвенная вытяжка

Далеко не все водоросли могут хорошо расти на чистых минеральных и обогащенных средах. Многие из них для нормального роста требуют наличия органических веществ. Из органических сред наибольшего внимания заслуживает почвенная вытяжка. Среда, приготовленная с ее использованием, обладают хорошей буферностью по отношению к железу и содержат микроэлементы. Но эти среды не пригодны для физиологических опытов по питанию водорослей.

Приготовление почвенной вытяжки – очень важный этап в технике культивирования водорослей. При получении почвенной вытяжки необходимо соблюдать ряд правил.

Слой садовой земли (высушенной и просеянной) толщиной 1-2см помещают на дно пробирки (колбы, бутылки и т.д.). Добавляют дистиллированную или деонизированную воду до заполнения $\frac{3}{4}$ сосуда, закрывают колбу ватной пробкой или крышкой. В течение 1ч в последующие 2 дня емкость со средой хорошо пропаривают. Обычно почвенная вытяжка не автоклавируется, так как в этом нет необходимости. Однако для многих водорослей (но не для всех!), стерильная почвенная вытяжка является хорошей питательной средой. Пропаренную вытяжку охлаждают в течение 24 часов, затем хранят в холодильнике.

Почвенная вытяжка может быть модифицирована путем прибавления следующих добавочных компонентов (до того, как туда будет добавлена почва):

- щепотки измельченного до порошкообразного состояния CaCO_3 для многих фототрофных пресноводных водорослей (Starr, Zeikus, 1993);
- щепотки NH_4MgPO_4 для *Botryococcus*, *Synechococcus* и некоторых эвгленовых (Starr, Zeikus, 1993);
- садового торфа, высушенного в течение 12ч для некоторых эвгленовых, флаголлат и других миксотрофных водорослей (Starr, Zeikus, 1993; Schlösser, 1994);
- ½ чайной ложки органического торфа и ¼ чайной ложки почвы для большинства ацидофильных водорослей (Starr, Zeikus, 1993).

2.3.4. Твердые питательные среды

2.3.4.1. Стандартный питательный агар

Г.Клебс (G.Klebs) и Н.Тишуткин (N.Tischutkin) были первыми исследователями, которые использовали твердые агаризованные среды для культивирования водорослей, так как питательный агар очень хорошо подходил для выращивания большинства пресноводных водорослей. Небольшое количество суспензии клеток распределяют по поверхности агара, и обычно клетки начинают медленно расти на его поверхности.

Агар обычно готовят в концентрации 1-2%. На таких средах хорошо растут многие водоросли. Но на агаризованных средах водоросли растут медленнее по сравнению с жидкими средами. Обычная процедура приготовления агаризованной среды описана ниже:

2-литровую колбу Эрленмейера с 1л среды нагревают до температуры 95°C в сухожаровом шкафу или на плитке, либо с помощью водяной бани. После этого в колбу медленно добавляют необходимое количество агара при постоянном перемешивании так, чтобы весь агар растворился в среде. Летом желательно агара брать больше, зимой – меньше, так как при более низкой температуре среды хорошо затвердевают.

Агаризованную среду используют в основном для выделения чистых культур, хранения музейных коллекций, а также для обрастающих форм водорослей. В практике культивирования водорослей применяют агаризованные чашки Петри или агаризованные косяки.

Приготовление агаризованных чашек Петри. Сначала агар автоклавируют при температуре 120°C в течение 20 минут, потом охлаждают его до 50-60°C, после чего разливают в стерильные чашки Петри. Нагретую среду следует держать при температуре 50-60°C, поместив на водяную баню. Если разлить по чашкам слишком горячий агар, будет образовываться конденсат. После застывания среды чашки следует перевернуть и хранить в воздухонепроницаемом контейнере (пластиковом пакете, закрытой емкости) при температуре 4°C в холодильнике.

Приготовление агаровых косяков в пробирках. Агар наливают в пробирки, затем стерилизуют в автоклаве так же при температуре 120° С в те-

чение 20 минут. После автоклавирования пробирки помещают на поверхность с уклоном и охлаждают. Разные компании изготавливают специальные стойки для застывания среды (Watanabe, 2005).

2.3.4.2. Питательные чашки с агаром

Некоторые водоросли не растут на поверхности агара, но они хорошо растут внутри него (Skinner, 1932). Для того, чтобы поместить клетки внутрь среды, готовят 1-2% агар, и когда стерильный раствор остынет до состояния геля, его перемешивают с жидкой суспензией культуры. Смесь перемешивают для равномерного распределения водорослей. Потом агар разливают в чашки Петри. Для водорослей, чувствительных к высоким температурам, можно использовать агарозу, застывающую при низкой ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$) или при очень низкой температуре ($8-17^{\circ}\text{C}$) (Shirai et al., 1989; Watanabe et al., 1998).

2.4. Рецепты питательных сред

Известно большое количество рецептов питательных сред. Наиболее распространенные из них приведены в Приложении 1. Там же приводятся заметки об их приготовлении и список видов водорослей, хорошо растущих на этих средах. Дополнительную информацию можно найти в каталогах штаммов коллекций культур (Сиренко и др., 1975; Starr, Zeikus, 1993; Schlösser, 1994; Tompkins et al., 1995; Andersen et al., 1997; Watanabe et al., 2000).

Выбирать оптимальную среду для выращивания той или иной водоросли удобно на основании использования методов математического планирования эксперимента. Этот же способ можно успешно применять и при определении оптимальных условий культивирования.

Контрольные вопросы

1. Какие требования предъявляются к химикатам, используемым для приготовления питательных сред?
2. Перечислите оборудование, необходимое для культивирования водорослей.
3. Какая посуда используется для выращивания водорослей?
4. Что такое агар?
5. Какова методика приготовления почвенной вытяжки?
6. Какую роль играют макро- и микроэлементы при культивировании водорослей?
7. Опишите методику приготовления маточных растворов.
8. Какие витамины необходимы для жизнедеятельности водорослей?
9. На какие группы делятся среды для культивирования?
10. Опишите методику приготовления агаризованных сред.

ГЛАВА 3. МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

3.1. Устройство микроскопа

Изучение не видимых невооруженным глазом клеток микроорганизмов, размеры которых не превышают десятков или сотен микрометров ($1\text{ мкм} = 0,001\text{ мм}$), возможно только при помощи микроскопов (от греч. «micros» – малый, «scopere» – смотрю). Эти приборы позволяют получать в сотни раз (световые микроскопы) и десятки-сотни тысяч раз (электронные микроскопы) увеличенное изображение исследуемых объектов.

При помощи микроскопа изучают морфологию клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию (от лат. «identificare» – отождествление) исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

Микроскоп состоит из двух частей: механической (подсобной) и оптической (главной) (Теппер и др., 1993).

3.1.1. Механическая часть микроскопа

К ней относят штатив, предметный столик и тубус (труба). Штатив имеет основание в виде подковы и колонку (тубусодержатель) в форме дуги. К нему примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции положения тубуса. Система приводится в движение вращением винтов грубой и тонкой настройки (рис.1).

Винт грубой настройки (макрвинт) служит для предварительной, ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта на фокус.

Винт тонкой настройки (микровинт) используют для последующей, более четкой установки на фокус. При полном повороте микровинта тубус передвигается на $0,1\text{ мм}$ (100 мкм). При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается по направлению к препарату, при вращении против нее идет от препарата.

На предметный столик помещают препарат с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях при помощи винтов. В центре столика находится отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. В столик вмонтированы два зажима (клеммы) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Если необходимо исследовать поверхность препарата, не допуская пропусков (это важно при подсчете), или если во время работы требуется повторное наблюдение какого-либо определенного участка препарата, на предметный столик помещают препаратоводитель. На этом приспособле-

нии имеется система линеек – нониусов, при помощи которых можно за-
координировать любую точку исследуемого объекта. Для этого при уста-
новке препаратоводителя совмещают центр вращения столика и оптиче-
скую ось системы микроскопа с центрировочной пластинкой препаратова-
дителя по кресту (отсюда предметный столик с препаратоводителем назы-
вают иногда крестообразным).

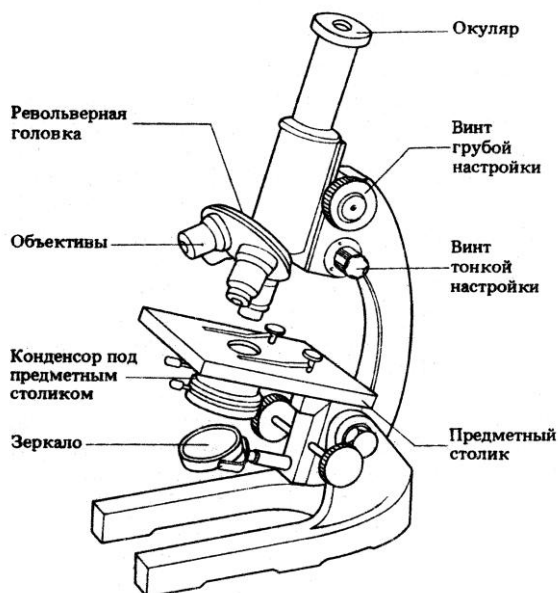


Рис. 1. Устройство светового микроскопа (Грин и др., 1996)

Тубус – это оправа, в которую заключены элементы оптической сис-
темы микроскопа. К нижней его части прикрепляют револьвер (объективно-
держатель) с гнездами для объективов. Современные модели микроскопов
имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечи-
вает горизонтальное положение предметного столика (Теппер и др., 1993).

3.1.2. Оптическая часть микроскопа

Она состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) (рис.1)
и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор). Все части
оптической и осветительной систем строго центрированы в отношении друг
друга. Во многих современных микроскопах зеркало и конденсор заменены
вмонтированным в прибор регулируемым источником света.

Осветительная система находится под предметным столиком. Зеркало
отражает падающий на него свет в конденсор. Одна сторона зеркала пло-
ская, другая – вогнутая. При работе с конденсором необходимо пользо-
ваться только плоским зеркалом. Вогнутое зеркало применяют при работе
без конденсора с объективами малых увеличений.

Конденсор (от лат. «condense» – уплотняю, сгущаю) состоит из двух-
трех короткофокусных линз. Он собирает лучи, идущие от зеркала, и на-
правляет их на объект. Конденсор необходим, прежде всего, при работе с

иммерсионной системой (см. 3.3.4). Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом.

Для регулирования интенсивности освещения в конденсоре есть ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. Чтобы получить более четкое изображение исследуемого объекта, регулируют степень раскрытия диафрагмы. Окрашенные препараты лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные – при уменьшенном отверстии диафрагмы.

Под конденсором располагается кольцевидный держатель для светофильтров (обычно к микроскопу прилагаются синее и белое матовые стекла). При работе с искусственным источником света светофильтры создают впечатление дневного освещения, что делает микроскопирование менее утомительным для глаз (Теппер и др., 1993).

Объектив (от греч. «objectum» – предмет исследования) – наиболее важная часть микроскопа. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта.

Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной, она обеспечивает увеличение. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущественно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов. Один из таких недостатков – следствие явления сферической аберрации. Это явление связано со свойством линз неравномерно преломлять периферические и центральные лучи. Первые обычно преломляются в большей степени, чем вторые, поэтому пересекаются на более близком расстоянии к линзе. В результате изображение точки приобретает вид расплывчатого пятна.

Хроматическая аберрация возникает при прохождении через линзу пучка лучей с различной длиной волны. Преломляясь по-разному, лучи пересекаются не в одной точке. Сине-фиолетовые лучи с короткой длиной волны преломляются сильнее, чем красные с большей длиной волны. Вследствие этого у бесцветного объекта появляется окраска.

К объективам, устраняющим сферическую аберрацию и частично хроматическую, относятся ахроматы. Они содержат до шести линз, корректируют первичный спектр (желто-зеленую часть спектра), но не устраняют вторичного спектра. Объективы, устраняющие хроматическую аберрацию и для вторичного спектра, называются апохроматами. В их составе может быть до 12 линз. В объективах-планахроматах и планапохроматах скорректированы и сферическая, и хроматическая аберрации. Их используют при микрофотографировании.

Апохроматы дают возможность устранить окрашивание объекта и получить одинаково резкое изображение от лучей разного цвета. Максимального эффекта при работе с апохроматами можно достичь, одновременно используя компенсационные окуляры, возмещающие оптические

недостатки объективов. Хроматическая ошибка таких окуляров обратна хроматической ошибке объектива. В результате хроматическая aberrация микроскопа оказывается почти полностью компенсированной.

Объективы бывают сухие и погружные, или иммерсионные. При работе с сухими объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. Оптический расчет иммерсионных объективов предусматривает работу с ними при погружении фронтальной линзы объектива в однородную жидкую среду. При работе с сухим объективом вследствие разницы показателя преломления стекла (1,52) и воздуха (1) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаза наблюдателя (рис. 2).

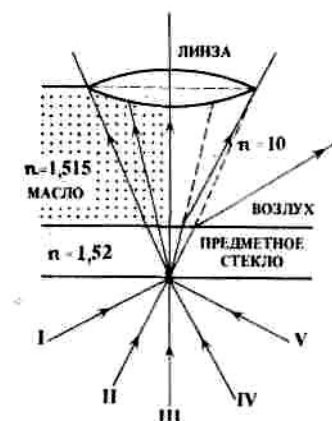


Рис. 2. Ход лучей в сухой и иммерсионной системах: I - V – лучи света (Теппер и др., 1993).

При работе с иммерсионным объективом между покровным стеклом и линзами объектива помещают кедровое масло, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла. Кедровое масло получают из семян виргинского можжевельника *Juniperus virginiana* L. или зеравшанской арчи *Juniperus seravschana* Kom. Последнее время иммерсионной жидкостью чаще служат синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу. Лучи в оптически однородной гомогенной среде не меняют направления (Теппер и др., 1993).

На оправе иммерсионных объективов есть черная круговая нарезка и обозначения: I – immersion (иммерсия), HI – homogen immersion (однородная иммерсия), OI (oil immersion), МИ – масляная иммерсия.

Объективы различают по увеличению. Собственное увеличение объективов определяют по формуле:

$$V = l / f,$$

где l – оптическая длина тубуса, или расстояние между фокальной плоскостью объектива и плоскостью изображения; для разных объективов оно колеблется в диапазоне 128... 180 мм;

f – фокусное расстояние объектива.

Чем больше фокусное расстояние, тем меньше увеличение объектива. Обозначения увеличений объективов отмечают на их оправе. Каждый объектив характеризуется, кроме того, определенной величиной рабочего расстояния в миллиметрах.

У объективов с малым увеличением расстояние от фронтальной линзы объектива до препарата (объекта) больше, чем у объективов с большим увеличением. В связи с этим необходимо строго следить, каким винтом – макрометрическим или микрометрическим – пользоваться при фокусировке

объектива. Так, у объективов с увеличением 8×, 40× и 90× рабочие расстояния соответственно 13,8; 0,6 и 0,12мм. Для иммерсионного объектива рабочее расстояние составляет 0,12мм, поэтому его нередко называют "близоруким". У объективов малых увеличений не только большие рабочие расстояния, но и большие поля зрения. В связи с этим рекомендуется начинать исследование препарата с небольшого увеличения.

Объективы рассчитаны на работу с покровным стеклом толщиной $0,17 \pm 0,1$ мм. Если стекло не соответствует стандарту, необходимо регулировать объектив вращением кольца коррекционной оправы, которой оснащены современные высококачественные объективы. При отсутствии такой оправы сферическую аберрацию, вызываемую покровным стеклом, следует устранить, поднимая или опуская тубус микроскопа (Теппер и др., 1993).

Одной из важных характеристик объектива является разрешающая способность, определяющая в конечном итоге разрешающую способность микроскопа в целом. Она определяет наименьшее расстояние между двумя точками на препарате, которые будут видны раздельно. Разрешающая способность объектива (**d**) зависит от его числовой (численной, или нумерической) апертуры (**A**) и длины волны света (**λ**), при которой идет наблюдение объекта:

$$d = \lambda / A$$

Длина волны света, воспринимаемая человеческим глазом, составляет 0,4...0,7мкм. Отсюда среднее значение $\lambda = 0,55$ мкм.

При определении разрешающей способности микроскопа следует различать два случая: освещение прямое (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа) и косое. При косом освещении разрешающая способность микроскопа бывает в два раза меньше, чем при прямом:

$$d = \lambda / 2A$$

Предел разрешающей способности объектива или наименьшее значение величины **d** можно представить следующим образом. Пусть значение λ – наименьшее (для более коротких, чем видимые, ультрафиолетовых лучей оно равно 350нм), а значение **A** – максимальное (в наиболее совершенных иммерсионных системах 1,4...1,6). В этом случае разрешающая способность объектива будет наибольшей по физическому смыслу и наименьшей по абсолютной величине.

При обычных условиях работы с микроскопом величина λ постоянна, так как объекты исследуются при обычном свете ($\lambda = 0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности зависит исключительно от возможности повышения числовой апертуры. Числовая апертура объектива характеризует его светособирающую способность и определяется по формуле:

$$A = n \times \sin 1/2\alpha,$$

где **n** – показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом;

α – угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива;

$1/2\alpha$ – половинный угол входного отверстия объектива.

Важно, чтобы значение величины n было максимальным. Повысить ее можно введением в промежуток между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом среды с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. На практике это достигается использованием иммерсионных объективов с введением кедрового масла ($n = 1$). Дальнейшего повышения n можно достичь введением среды с показателем преломления более высоким, чем у стекла.

Важно также, чтобы значение величины $\sin 1/2\alpha$ было максимальным. Чем больше $\sin 1/2\alpha$, тем выше числовая апертура и разрешающая способность объектива. Предел повышения $\sin 1/2\alpha$ зависит от степени кривизны фронтальной линзы (это учитывается при изготовлении иммерсионных объективов) и числовой апертуры конденсора.

Высокоапертурные объективы применяют только одновременно с высокоапертурным конденсором. Если апертура конденсора меньше апертуры объектива, то возможности последнего оказываются не полностью использованными (Теппер и др., 1993).

Следует помнить, что повысить величину $\sin 1/2\alpha$ при использовании иммерсионных объективов можно максимальным поднятием конденсора, что определяется светособирающей функцией данного приспособления. Поскольку его линзы короткофокусные, световые лучи фокусируются конденсором на близком расстоянии, т.е. предусматривается фокусировка в плоскости объекта. Если конденсор опущен, его функция, по существу, нарушается.

В свою очередь, окуляр микроскопа служит непосредственным продолжением "линз" человеческого глаза. Преломляющую систему глаза можно рассматривать как двояковыпуклую линзу со средним фокусным расстоянием 15см (расстояние наилучшего зрения 25см). Тесная связь с глазом человека отражена в названии окуляра (от греч. «oculus» – глаз). Окуляр состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой, или собирающей (нижней), заключенных в металлическую оправу. Назначение полевой линзы – собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы.

Назначение окуляра – в прямом мнимом увеличении действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра выгравировано на оправе. Рабочее увеличение окуляров колеблется в пределах от 4× до 15×. Собственное увеличение окуляра вычисляют по формуле, применяемой для определения увеличения луп:

$$K = L / F,$$

где L – расстояние наилучшего зрения, равное 25см;

F – фокусное расстояние линз окуляра.

Окуляры бывают различных типов. Выбор их зависит от объектива. С ахроматическими объективами малых и средних увеличений и планахроматами малых увеличений применяют окуляры Гюйгенса или ортоскопические окуляры; с апохроматическими, планахроматическими и ахроматическими объективами больших увеличений – компенсационные окуляры.

Окуляры Гюйгенса состоят из двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклой стороной к объективу. Нижняя линза обычно имеет больший диаметр и большее фокусное расстояние, чем верхняя. Фокальная плоскость окуляров Гюйгенса располагается между глазной линзой и линзой поля зрения.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться двойными окулярами – бинокулярной насадкой. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5×) и снабжены коррекционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55...75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение (Теппер и др., 1993).

3.2. Основные технические характеристики микроскопа

Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

3.2.1. Увеличительная способность микроскопа

Коэффициент увеличения микроскопа (**D**) определяется произведением увеличения окуляра (**K**) и увеличения объектива (**V**) по формуле:

$$D = K \times V.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение 2000× раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения используемых в обычных микроскопах достигают 1400×. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть полезное увеличение. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500...1000 раз. Например, для объектива с увеличением 40×, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет 325...650×. Такое увеличение позволяет различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для объектива 40× следует брать окуляр 15×, чтобы получить общее увеличение в пределах полезного. Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Более того, применение оку-

ляра с большим увеличением приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаза наблюдателя, и возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Если объектив имеет увеличение $90\times$ (числовая апертура 1,25), то полезное увеличение для него равно $1250\times$. Следовательно, и здесь не надо применять окуляры с увеличением более $15\times$, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения. Беспользные увеличения могут принести пользу лишь при подсчете мельчайших частиц в поле зрения, если при этом не требуется рассмотрения их структуры (Теппер и др., 1993).

3.2.2. Разрешающая способность микроскопа

Эта характеристика особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется главным образом объективом и конденсором (см. 3.1.2). Расчет разрешающей способности микроскопа проводят по формуле:

$$d = \lambda / 2A$$

Максимальная разрешающая способность светового микроскопа 0,2мкм. Разрешающая способность микроскопа тем выше, чем меньше абсолютная величина d .

Рассмотрим расчет разрешающей способности микроскопа. Если увеличение объектива $V = 40\times$, $A = 0,65$, то $d = (0,55\text{мкм}) / (2 \times 0,65) = 0,42\text{мкм}$; если $V = 90\times$, $A = 1,25$, то $d = (0,55\text{мкм}) / (2 \times 1,25) = 0,22\text{мкм}$.

Среди существующих моделей современных микроскопов отечественного производства наиболее распространены: МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, МБИ-10, МБР-1 и МБР-1А (Теппер и др., 1993).

3.3. Работа с микроскопом

3.3.1. Общие правила работы с микроскопом

Место для микроскопа выбирают подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью меньше утомляет глаза. Лучше смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. При работе с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров сливались в одно.

Переносят микроскоп, держа одной рукой за штатив, другой – за основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот, щелочей. Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы. Во время работы желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация паров ведет к его порче.

Линзы должны быть всегда чистыми. Микроскоп следует хранить в чехле. Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей (Теппер и др., 1993).

3.3.2. Установка освещения

Удобнее пользоваться искусственным источником света – он более постоянен, чем дневной, лучше освещает объект, что важно при работе с сильными объективами (90×). Наиболее известен метод освещения препарата по Келеру. Рациональное освещение объекта достигается при использовании осветителей типа ОК-7, ОИ-9 и ОИ-19. Осветитель с низковольтной лампой устанавливают на расстоянии 25...30см от микроскопа при помощи соединительной планки (крестовины). Полевая диафрагма осветителя открыта; используют объектив 8×, зеркало с плоской поверхностью; конденсор поднят.

Препарат в поле зрения микроскопа фокусируют при открытых диафрагмах осветителя и конденсора. Из осветителя удаляют матовое стекло. Полевую диафрагму осветителя закрывают. На зеркало помещают белый лист бумаги для получения четкого изображения нити лампы осветителя.

Движением зеркала перемещают световой поток в поле зрения микроскопа. Фокусируют препарат. Опускают конденсор до тех пор, пока изображение (проекция) краев полевой диафрагмы осветителя в плоскости препарата не станет четким. Центрируют легкими движениями зеркала изображение отверстия диафрагмы. Наблюдая в микроскоп, постепенно открывают полевую диафрагму осветителя так, чтобы освещенный круг ее заполнил все поле зрения микроскопа; лучше, если он немного выйдет за пределы поля зрения.

Положение осветителя, зеркала, конденсора микроскопа в дальнейшем не должно изменяться! Порядок установки света по Келеру рекомендуют также и при темнопольной и фазово-контрастной микроскопии (Теппер и др., 1993).

3.3.3. Настройка микроскопа для работы при малом увеличении

Исследуемый объект на предметном столике микроскопа должен быть освещен. Для этого пользуются специальным осветителем, светом из окна или от настольной лампы. В двух последних случаях используют вогнутую поверхность находящегося под предметным столиком зеркала. С помощью зеркала свет направляют через отверстие в предметном столике. Если имеется подходящий конденсор, то для направления света через него используют плоскую поверхность зеркала.

С помощью винта грубой настройки поднимают вверх тубус микроскопа и поворачивают револьверную головку до тех пор, пока объектив с

малым увеличением ($\times 10$ или 16мм) не попадет в паз тубуса (при этом раздается щелчок).

Исследуемый препарат помещают на предметный столик микроскопа таким образом, чтобы находящийся под покровным стеклом материал находился над серединой отверстия в предметном столике.

Глядя на предметный столик и препарат сбоку, надо опустить тубус с помощью винта грубой настройки до тех пор, пока объектив с малым увеличением не окажется примерно в 5мм от препарата. Далее, глядя в окуляр микроскопа и медленно поворачивая винт грубой настройки, необходимо добиться попадания объекта исследования в фокус конденсора (Теппер и др., 1993).

3.3.4. Настройка микроскопа для работы при большом увеличении

При работе с объективом большого увеличения для создания достаточного освещения необходим искусственный свет. Для этого используют настольную лампу или специальный осветитель для микроскопа с матовой лампочкой. При работе с лампой накаливания необходимо между ней и микроскопом поместить лист бумаги, повернуть зеркало плоской поверхностью вверх так, чтобы свет, отражаясь, попадал в микроскоп, затем сфокусировать конденсор, не убирая препарата с предметного столика. Поднять конденсор на расстояние 5мм от предметного столика. Глядя в микроскоп, нужно поворачивать винт грубой настройки до тех пор, пока объект не попадет в фокус, а изображение лампы не наложится точно на препарат. Поместите конденсор несколько вне фокуса так, чтобы изображение лампы исчезло. Теперь освещение должно быть оптимальным. В конденсор вмонтирована диафрагма. Ею регулируют величину отверстия, через которое проходит свет. Это отверстие должно быть открыто как можно шире. Таким образом достигается максимальная четкость изображения.

Револьверную головку необходимо поворачивать до тех пор, пока объектив большого увеличения ($40\times$ или 4мм) не попадет в паз. Если на малом увеличении фокус уже был установлен, то при повороте револьверной головки объектив большого увеличения автоматически установится приблизительно в фокусе. Фокусирование производится движением объектива вверх с помощью винта тонкой настройки.

Если при движении объектива с линзами большого увеличения фокус не устанавливается, то глядя на предметный столик сбоку, следует опустить тубус микроскопа до тех пор, пока линза почти не коснется препарата. Глядя в микроскоп и поворачивая винт тонкой настройки, нужно медленно поднимать объектив до тех пор, пока изображение не попадет в фокус (Теппер и др., 1993).

3.3.5. Работа с иммерсионной системой микроскопа

Для того чтобы получить более сильное увеличение, чем при работе с обычным объективом большого увеличения, необходимо использовать масляно-иммерсионную линзу. Способность линзы собирать свет в значительной степени усиливается, если между линзой объектива и покровным стеклом поместить жидкость. Жидкость должна иметь тот же показатель преломления, что и сама линза. Поэтому в качестве жидкости обычно используют кедровое масло. При работе с иммерсионным объективом ($V = 90\times$; $A = 1,25$) устанавливают зеркало плоской стороной и поднимают конденсор.

Далее необходимо положить препарат на предметный столик и сфокусировать изображение так же, как при работе с обычным большим увеличением. Вместо объектива с линзой большого увеличения установить объектив с масляно-иммерсионной линзой.

Каплю кедрового масла необходимо поместить на покровное стекло непосредственно над исследуемым объектом. Снова сфокусировать изображение теперь уже под малым увеличением, затем поворотом revolverной головки установить объектив с масляно-иммерсионной линзой так, чтобы его кончик касался капли масла.

Глядя в микроскоп, очень осторожно сфокусировать линзу с помощью винта тонкой настройки. Фокусная плоскость линзы должна находиться всего в 1 мм от поверхности покровного стекла.

Закончив работу, необходимо удалить с линзы масло мягкой тряпочкой, смоченной очищенным бензином.

Иммерсионную жидкость хранят в специальных двухкамерных масленках. В наружную камеру наливают ксилол или очищенный бензин для очистки объективов от масла, во внутреннюю – кедровое масло. Камеру с маслом герметично закрывают пробкой, в которую вставляют стеклянную палочку для нанесения капли масла на препарат (Теппер и др., 1993).

3.4. Измерение объектов

Измерять клетки микроорганизмов в микрометрах можно на фиксированных и живых препаратах при помощи шкалы окулярного микрометра – окулярной линейки. У кокков определяют диаметр клеток, у других форм бактерий – длину и ширину.

Окулярная линейка – круглая стеклянная пластинка, по центру которой нанесена шкала делений (50 или 100 делений) общей длиной 5 мм. Окулярную линейку устанавливают шкалой вверх на диафрагму окуляра. Ставят препарат и определяют, скольким делениям линейки соответствует длина и ширина клетки. Измеряют не менее 10...20 клеток.

Чтобы рассчитать истинные размеры клеток, определяют цену деления окулярной линейки при помощи объектного микрометра. Последний

представляет собой металлическую пластинку в форме предметного стекла с отверстием в центре; в отверстие помещено стекло с линейкой (шкала из 100 делений). Общая длина шкалы объектного микрометра 1мм, величина одного деления 10мкм (0,01мм).

Объектный микрометр помещают вместо препарата на столик микроскопа, фокусируют изображение линейки при малом увеличении, затем перемещают в центр поля и меняют объектив на тот, при котором измеряли клетки. Перемещая столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают объектный и окулярный микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую.

Определение цены деления окулярного микрометра проводят по принципу нониуса, т.е. совмещают одну из черт шкалы окулярного микрометра с чертой объектного микрометра и находят следующее совмещение. Допустим, в двух делениях объектного микрометра (20мкм) уместится пять делений окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра при данном увеличении равно 4мкм (20:5).

Зная, скольким делениям окулярной линейки соответствует длина и ширина изучаемых клеток, умножают цену деления окулярного микрометра на эти числа. Вычисленные значения цены делений линейки справедливы только для данной системы окуляр – объектив (Теппер и др., 1993).

Контрольные вопросы

1. Опишите устройство микроскопа.
2. Как определить увеличительную способность микроскопа?
3. Какова максимальная разрешающая способность микроскопа?
4. Перечислите правила работы с микроскопом.
5. Как настроить освещение микроскопа?
6. Чем отличается настройка микроскопа для работы при малом и большом увеличении?
7. В каких случаях используют иммерсионную систему микроскопа?
8. Как измеряют клетки микроорганизмов?

ГЛАВА 4. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

4.1. Общие представления о стерилизации

Стерилизация, или обеспложивание (от лат. «sterilis» - бесплодный) означает полное уничтожение зародышей микроорганизмов в питательных средах, посуде и т.д. Стерилизация очень важна в фикологических (альгологических) исследованиях, особенно при поддержании живых организмов в качестве изолированных штаммов в культуре. Использование методов стерилизации в комбинации со стерильным оборудованием и материалами позволяет проводить более точные эксперименты, свободные от влияния последствий нежелательных организмов. Стерилизация является простой процедурой, однако требует тщательного соблюдения правил стерильности при работе. Следует отметить, что и после стерилизации оборудование может быстро загрязниться при взаимодействии с воздухом, который содержит пыль и споры микроорганизмов.

Термин «дезинфекция» иногда путают со стерилизацией. Дезинфекцию обычно определяют как операцию, которая полностью уничтожает или уменьшает число патогенных микроорганизмов в окружающей среде или на поверхности. Например, обработка рук и поверхностей детергентом или 70% этанолом перед обработкой культур или стерилизацией оборудования является дезинфицирующей процедурой, которая является частью стерильной методики. Ниже приводится описание различных методов стерилизации, включая и дезинфекцию, которые обычно используются в альгологических исследованиях.

Существует множество методов стерилизации, которые условно можно разделить на четыре категории: стерилизацию путем нагревания, стерилизацию при помощи электромагнитного излучения, стерилизацию при помощи фильтрации и химическую стерилизацию (см. табл. 1). Стерилизация с помощью нагревания является обычным способом стерилизации и, как правило, требует высоких температур ($\geq 100^{\circ}\text{C}$) при условии, что стерилизуемые материалы устойчивы к высоким температурам (например, стекло, металлические инструменты, алюминиевая фольга). Жидкости стерилизуются методом фильтрации, когда они содержат нестойкие компоненты, разрушающиеся при высокой температуре.

Таблица 1

Использование и ограничение использования различных методов
стерилизации (Kawachi, Noël, 2005)

| Категория | Метод | Сущность метода | Использование | Ограничение |
|----------------------------|----------------------------|--|--|---|
| Высокая температура | Пламя | Непосредственное нагревание огнем (горелка Бунзена, спиртовка) | Поверхностная стерилизация (горлышки пробирок, микробиологические петли, стеклянные пипетки) | Не стойкие к нагреванию материалы (например, большинство пластмасс) |
| | Автоклавирование | 2атм (давление автоклава), 121°C, время зависит от объема жидкости (10, 20мин для маленьких объемов, 1ч – для больших) | Наиболее распространенный метод, используемый для стерилизации жидкостей, агара, стеклянной и металлической посуды, оборудования | Не стойкие к нагреванию материалы, изменение pH растворов |
| | Сухой жар | 250°C, 3-5ч | Стеклянная и металлическая посуда и оборудование | Не стойкие к нагреванию материалы, жидкости |
| | Пастеризация | 66-80°C в течение не менее 30минут, с последующим быстрым охлаждением (4-10°C) | Жидкости с не устойчивыми к нагреванию компонентами | Неполная стерилизация (не уничтожающая все споры) |
| | Тиндаллизация | 60-80°C, 30мин, с последующим быстрым охлаждением, цикл повторяется 3 раза в течение 3 дней | Жидкости с не устойчивыми к нагреванию компонентами | Требуется длительного времени |
| Фильтрация | Фильтрация | Фильтр с размером пор $\leq 0,2\mu\text{м}$ | Жидкости с неустойчивыми к нагреванию компонентами | Небольшие объемы, вязкие жидкости, не удаляются жидкости |
| Электромагнитное излучение | Микроволновая печь | 10мин при 700Вт; 5мин с интервалами при 600Вт. Для сухих материалов: 20мин при 600Вт с водой, 45мин без воды | Жидкости: небольшие объемы среды, сухие материалы, стеклянная посуда | Небольшие объемы жидкости; сухие материалы с водой требуют предварительного удаления воды |
| | Ультрафиолетовое излучение | 260нм, 5-10мин | Поверхность материалов, рабочие поверхности | Не устойчивые к излучению пластики |

| | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|---|---|---|
| Химические вещества | Отбеливатель (гипохлорит натрия) | 1-5мл на 1л, несколько часов | Большой объем воды для аквакультуры | Цисты могут выживать; требуется последующая нейтрализация (например, тиосульфат натрия, 250г/л маточного раствора, 1мл на 4мл отбеливателя) |
| | Этанол | 50-70% раствор | Очень распространенный метод общей дезинфекции | Некоторые устойчивые микроорганизмы |
| | Оксид этилена | Герметичная комната или сосуд с высоким давлением | Пластиковые или каучуковые продукты, не стойкие к нагреванию продукты | Взрывчатые вещества, химические остатки проблематичны или токсичны |
| | Хлорид ртути (HgCl ₂) | 0,1%; добавить небольшое количество NaCl и разбавить дистиллированной водой | Антисептик и средство дезинфекции | Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками |
| | Фенол (карболовая кислота) | 3% раствор | Антисептик и средство дезинфекции | Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками |
| | Раствор крезола | 3-5% раствор | Антисептик и средство дезинфекции | Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками |
| | Формальдегид (формалин) | 2-5% раствор | Антисептик и средство дезинфекции | Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками |

Электромагнитные волны (например, ультрафиолетовое излучение, γ -излучение, x-излучение и микроволновое излучение) используются как альтернативные способы стерилизации для материалов, которые не выдерживают высокой температуры (например, изделия из пластика или жидкости с неустойчивыми компонентами). В настоящее время одноразовая пластиковая посуда стерилизуется при помощи γ -излучения. Наконец, для стерилизации могут быть использованы различные химикаты, однако следы химических веществ могут сохраняться после обработки, и могут быть вредными для водорослей и исследователей. Поэтому способы химической стерилизации в настоящее время редко используются в лабораториях (Kawachi, Noël, 2005).

4.2. Процедура предварительной стерилизации

4.2.1. Стерилизация новой посуды

Новая стеклянная и пластиковая посуда, исключая готовые к использованию стерильные продукты, должна быть стерилизована перед первым использованием. Процедура состоит из погружения посуды в раствор соляной кислоты (обычно концентрацией 1моль) на 1 неделю, с последующим многократным ополаскиванием проточной водой и непосредственно перед высушиванием – дистиллированной водой. Существует и менее строгий метод, представляющий собой промывание новой стеклянной и пластиковой посуды нейтральным детергентом для лабораторного использования с последующим промыванием и высушиванием.

Существует несколько видов пробок для сосудов: устойчивые к нагреванию пластиковые, металлические и закручивающиеся силиконовые пробки (рис. 3). Перед первым использованием необходимо проверить целостность материалов пробок, потому что некоторые материалы (например, новые полиэтиленовые пробки) могут выделять токсичные вещества во время автоклавирования (Kawachi, Noël, 2005).

4.2.2. Стерилизация грязной посуды

Стандартные методы очистки состоят из погружения сосудов на несколько часов в емкость с нейтральным детергентом, очистки сосудов щеткой или губкой. Затем сосуды несколько раз ополаскиваются водопроводной водой. Ополаскивать посуду нужно до тех пор, пока не будет полной уверенности в том, что все детергенты удалены (хороший результат достигается при ополаскивании более чем 10 раз). Последний раз посуду нужно ополоснуть дистиллированной водой и высушить в месте, защищенном от пыли.

Другая стеклянная посуда, такая как чашки Петри, часовые стекла, предметные стекла также должны быть очищены с помощью процедуры, описанной выше. Если клетки водорослей сильно прикрепились к внутренней стороне сосуда, перед процедурой очистки посуду необходимо погрузить в горячую воду на несколько часов. Для очистки закручивающихся пробок для пробирок и колб используют детергент (с последующей очисткой с помощью щетки при необходимости), затем ополаскивают и промывают так, как описано выше.

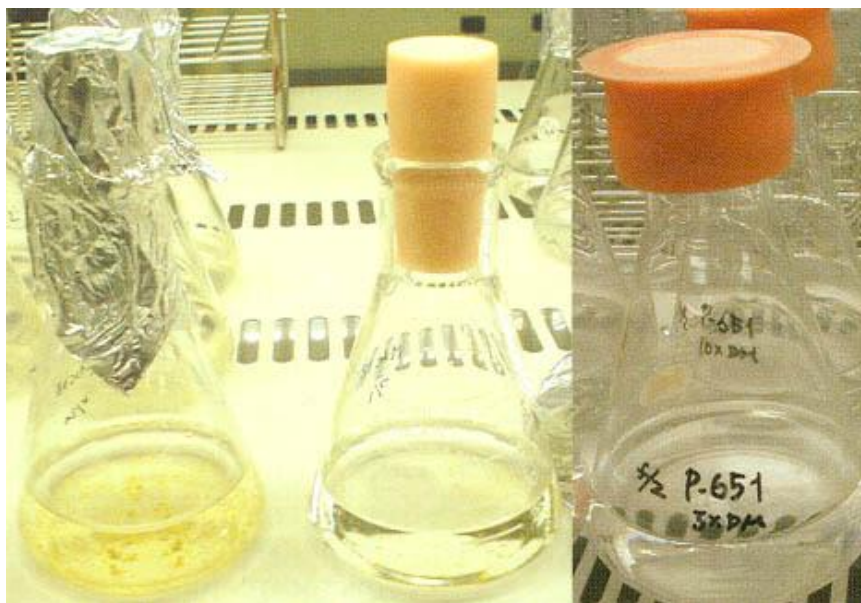


Рис. 3. Колбы Эрленмейера с силиконовыми пробками. Слева - покрытые алюминиевой фольгой; в центре - стандартная силиконовая пробка; справа - силиконовая пробка с дополнительным щитом поверх пробки (Kawachi, Noël, 2005)

Посуда, неоднократно используемая для культивирования водорослей, должна быть автоклавирована для того, чтобы уничтожить все споры и клетки, так как живые клетки, особенно цисты, могут загрязнить среду, если их не уничтожить полностью. После процедуры посуду следует охладить, очистить и ополоснуть водой (Kawachi, Noël, 2005).

4.2.3. Стерилизация стеклянных пипеток

Стеклянные пипетки, используемые для пересадки клеток, необходимо немедленно сполоснуть проточной водой после использования для того, чтобы клетки водорослей не присохли к стеклянной поверхности. Если пипетки закрыты специальными ватными пробками, их нужно удалить. Если нет возможности сполоснуть пипетку сразу после использования, ее нужно поместить в пластиковый цилиндрический контейнер с водой и ополоснуть позже.

Для очистки пипетку необходимо поместить в контейнер с детергентом на 1 или 2 дня. Для полного промывания пипетки можно использовать специальную сверхзвуковую ванну и пипетку с эффектом сифона. Затем пипетки промывают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу при 150°C. После этого в кончики пипеток вставляют ватные пробки, прокалывают кончики пробок в пламени для удаления волокон ваты, пипетки помещают в металлический контейнер и автоклавируют или стерилизуют с помощью сухого жара (Kawachi, Noël, 2005).

4.3. Стерилизация питательных сред

4.3.1. Стерилизация маточных растворов

В большинстве случаев, каждый компонент среды готовится в сосудах, которые можно автоклавировать. Для стерилизации каждый раствор следует автоклавировать или стерилизовать фильтрацией и хранить при температуре 4°C. Витамины нужно хранить при температуре – 20°C. Для поддержания чистоты маточных растворов при работе с ними следует соблюдать правила стерильности. Если в растворах наблюдаются признаки бактериального или грибного загрязнения, их нужно подвергнуть стерилизации и содержимое вылить (Kawachi, Noël, 2005).

4.3.2. Стерилизация жидких питательных сред

Стерилизацию жидких питательных сред обычно проводят методом автоклавирования (при температуре 121°C в течение 20 минут). При стерилизации питательной среды особое внимание следует уделять ее состоянию. Если она изменяет свой цвет или наблюдается образование осадка, то эта среда становится непригодной для использования. Среда может измениться из-за множества причин, поэтому ее состояние нужно проверять на каждом этапе приготовления. Нестойкие к температуре компоненты, такие, как витамины, можно добавить после завершения процедуры, используя метод стерилизации. Тиндаллизация используется вместо автоклавирования, когда следует избегать разложения чувствительных к нагреванию компонентов.

Для стерилизации питательных сред можно также использовать и микроволновую печь. При этом методе стерилизации можно достичь максимальной температуры не менее 84°C (Keller et al., 1988; Hoff, Snell, 2001). Это позволяет добавлять не стойкие к нагреванию компоненты перед стерилизацией. Однако витамины лучше добавлять уже после стерилизации. Стерилизация в микроволновой печи занимает мало времени (10 минут или менее), и это позволяет избежать как загрязнения тяжелыми металлами, так и осаждения карбонатов. Однако этот вид стерилизации можно использовать только для очень небольших объемов жидкостей ($\leq 1-1,5$ л), принимая во внимание то, что автоклавирование позволяет стерилизовать большие объемы жидкостей (например, 20л) (Kawachi, Noël, 2005).

4.3.3. Стерилизация агаровых питательных сред

Как и для жидких сред, для стерилизации агаровых сред обычно используют автоклавирование (при температуре 121°C в течение 20 минут). При использовании пробирок или чашек Петри агар распределяется соответственно в стерильную пробирку или чашку Петри в стерильных усло-

виях и затем охлаждается. Для уменьшения загрязнения объем агара не должен превышать половины объема пробирки или чашки Петри.

Для агаровых культур, содержащих не стойкие к нагреванию компоненты, чувствительные компоненты следует добавлять асептически после автоклавирования, но перед застыванием агара (приблизительно при температуре 50-60°C, для агара со стандартной температурой застывания) (Kawachi, Noël, 2005).

4.4. Способы стерилизации

4.4.1. Автоклавирование

Автоклавирование является наиболее эффективным и популярным способом стерилизации жаропрочных материалов и обычно используется для стерилизации жидкостей. Автоклав является специальным аппаратом, состоящим из котла с толстыми стенками, внутри которого происходит высокотемпературная стерилизация благодаря высокому давлению (см. рис. 4). На массивной крышке или сбоку котла есть кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает, насколько давление пара внутри котла выше нормального атмосферного. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления предохранительный клапан устанавливают так, чтобы дать выход пару.

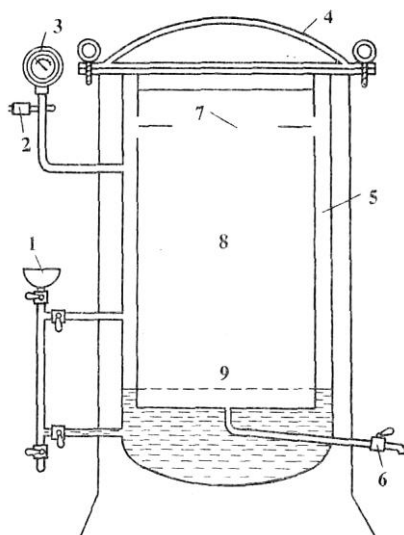


Рис. 4. Схема автоклава (Теппер и др., 1993)

Примечание: 1 - воронка, через которую автоклав заправляют водой; 2 - предохранительный клапан; 3 - манометр; 4 - крышка автоклава; 5 - водопаровая камера; 6 - кран для выпуска воздуха; 7 - отверстие, через которое пар поступает в стерилизационную камеру; 8 - стерилизационная камера; 9 - подставка для размещения стерилизуемых материалов

Показателям манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура (табл. 2). Обычно автоклавирование проводят при температуре 120°C и давлении 1атм в течение 20 минут.

Таблица 2

Температура стерилизации и давление в автоклаве
(Теппер и др., 1993)

| Давление, атм | Температура, °С |
|---------------|-----------------|
| 0,5 | 115 |
| 1,0 | 120 |
| 1,5 | 127 |
| 2,0 | 133 |

Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, закручивают крышку и начинают подогрев. Кран оставляют открытым до тех пор, пока весь воздух, находящийся в автоклаве, не будет вытеснен парами воды. Когда пар начнет выходить из крана непрерывной струей, кран закрывают, доводят давление пара в автоклаве до 1атм и поддерживают на этом уровне 20-30 минут. Затем нагрев прекращают, ждут, пока стрелка манометра дойдет до 0, осторожно открывают кран и спускают пар. Только потом отвинчивают крышку автоклава. Если кран будет открыт раньше, чем упадет давление, то жидкость в стерилизуемых сосудах закипит и вытолкнет из них пробки.

Для контроля за работой автоклавов среди стерилизуемых предметов можно закладывать специальные тесты-ампулы, содержащие химические вещества, которые плавятся при определенной температуре. Например, у бензонафта температура плавления 110°C, у антипирина - 113°C.

Автоклав используют и для дробной стерилизации текучим паром. В этом случае крышку не закручивают, чтобы дать свободный выход пару (Теппер и др., 1993).

Продолжительность процедуры зависит от объема стерилизуемой жидкости. Например, автоклавирование в течение 10 минут при температуре 121°C достаточно для стерилизации пробирок диаметром 18мм, в то время как для стерилизации 10л жидкости необходим 1 час. При соблюдении всех правил, процедура позволяет уничтожить все микроорганизмы, даже устойчивые к высоким температурам споры бактерий и грибов. При автоклавировании поверхность и внутренние части стерилизуемых материалов увлажняются. Поэтому после завершения процесса в большинстве случаев необходимо высушивание в автоклаве при помощи специального сухого режима или в сушильном шкафу при температуре 150°C.

При автоклавировании необходимо соблюдать некоторые меры предосторожности. Для жидкостей важно оставлять свободное пространство в емкости (колбе или пробирке), равное по крайней мере одной четвертой части объема сосуда, с учетом образования пара и кипения жидкости. Перед началом процесса необходимо ослабить закручивающиеся крышки с пробирок для предотвращения разрушения в результате высокого давления.

Для этикетирования сосудов для автоклавирования необходимы стойкие к высокому давлению и температуре материалы. Можно рекомендовать использование специальной ленты. На этикетке необходимо указать дату. После завершения процедуры необходимо закрутить крышки пробирок.

Если необходимо предотвратить загрязнение следовыми количествами тяжелых металлов, нужно использовать другие методы стерилизации (Price et al., 1989).

4.4.2. Стерилизация сухим жаром

Этот метод стерилизации применяют для обработки посуды и сухих материалов (но не жидкостей!). Стерилизация сухим жаром позволяет устранить недостатки автоклавирования и также используется для высушивания пробок в пипетках. Стерилизация сухим жаром требует более высокой температуры, чем стерилизация автоклавированием. Самый строгий метод требует нагревания до 250°C в течение 3-5 ч, однако в большинстве случаев, достаточно нагревания до 150°C в течение 3-4 ч.

Для этого метода стерилизации чаще всего используют печь Пастера (рис.5).

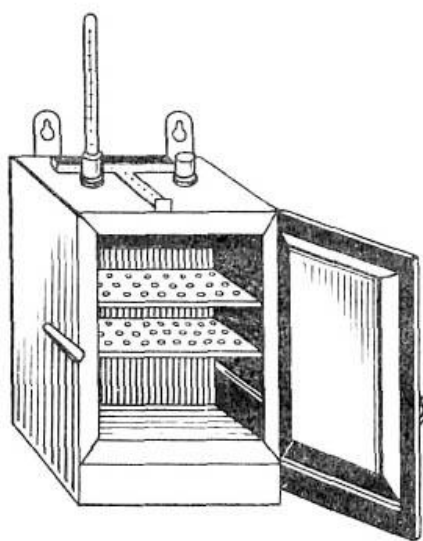


Рис. 5. Оборудование для стерилизации. Печь Пастера (Теппер и др., 1993)

При использовании этого метода необходимо соблюдать меры предосторожности. Температура в разных частях сухожарового шкафа может быть выше, чем указано на градуснике, что может привести к разрушению материалов. Стерилизуемая посуда должна быть сухой и завернутой в специальные материалы (например, в алюминиевую фольгу) или помещена в специальный контейнер (например, в коробку из нержавеющей стали или стеклянную емкость). После окончания стерилизации не следует сразу же открывать двери шкафа, так как возможно загрязнение материалов в результате конвекции воздуха (Karachi, Noël, 2005).

4.4.3. Пастеризация и тиндаллизация

В XIX веке Д.Тиндалл и Л.Пастер разработали (для других целей) процедуры для кипения растворов, сходные со стерилизацией пищи. В дальнейшем эти процессы стали называть пастеризацией и тиндаллизацией. Фикологи адаптировали и модифицировали эти методы для жидкостей, которые нельзя нагревать выше 100°C или автоклавировать. Высокая температура достигается с помощью пара без давления, поэтому пропаривание часто используется в фикографии. Э.Прингшейм (Pringsheim, 1946) рекомендовал пропаривание для приготовления двухфазных почвенно-водных сред. Кроме того, пропаривание часто используется для приготовления обогащенных сред на основе морской воды. Существуют различные модификации этого метода, хотя нет их четкого определения. Метод пропаривания можно определить как метод нагревания жидких растворов до высокой температуры и сохранения этой температуры в течение некоторого промежутка времени, после которого следует быстрое охлаждение.

При пастеризации жидкость нагревается до температуры 66-80°C, выдерживается при этой температуре не менее 30 минут и после этого быстро охлаждается до температуры меньше 10°C (рис. 6).

При тиндаллизации процесс схож со стерилизацией: в первый день материалы остаются охлажденными до следующего дня, потом они снова нагреваются и охлаждаются, и цикл повторяется на третий день (рис. 6). Повторение процесса позволяет уничтожить цисты, которые прорастают после первого или второго цикла нагревания.

В аквакультуре, когда используются большие емкости с пресной или морской водой, используют краткосрочную стерилизацию. Получают пар (часто с помощью домашней печи), который пропускают между титановыми тарелками для обмена тепла. Морская или пресная вода проходит между тарелками, где она нагревается до 70°C. Эта процедура не уничтожает самые устойчивые споры, но убивает большинство живых организмов в воде (Kawachi, Noël, 2005).

Пастеризация



Тиндаллизация

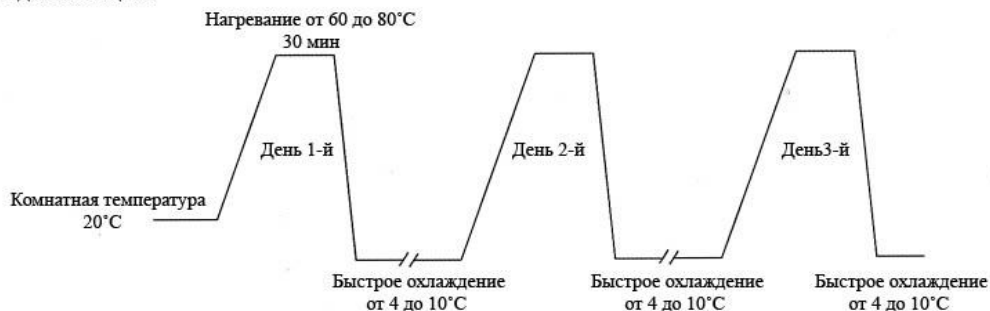


Рис. 6. Схематическое сравнение процессов пастеризации и тиндаллизации (Kawachi, Noël, 2005)

4.4.4. Стерилизация фильтрацией

Стерилизация фильтрацией используется для неустойчивых компонентов, таких как витамины, или изменчивых компонентов жидкостей, таких как органические растворители. Этот метод также используется для удобства и скорости, когда требуется стерилизация небольшого объема жидкости. Существует большое разнообразие фильтров, различающихся размером пор, составом, цветом и размером. Для стерилизации питательных сред обычно используются мембранные фильтры, которые могут подвергаться автоклавированию. Диаметр пор должен быть менее 0,2 мкм, однако необходимо отметить, что вирусы могут проходить через отверстия этого диаметра. Если раствор имеет высокую вязкость или содержит взвешенные частицы, необходима предварительная фильтрация через фильтр с диаметром пор 1 мкм. В настоящее время в продаже имеются как одноразовые фильтры, так и фильтры для многократного использования. Стерильные одноразовые фильтры удобнее, но они относительно дороже. Оборудование для многократной фильтрации (стеклянные или поликарбонатные материалы) необходимо автоклавировать, мембранные фильтры и сопутствующие материалы необходимо помещать в специальные мешки или заворачивать в алюминиевую фольгу. После автоклавирования наборы для фильтрации необходимо высушить в сухожаровом шкафу при температуре

120°C. После остывания фильтра процесс фильтрации можно проводить на лабораторном столе, если резервуар с отфильтрованной жидкостью стерильно закрыт. После фильтрации необходимо перелить чистые растворы в стеклянные емкости с соблюдением условий стерильности.

Для очень маленьких объемов жидкости используют специальные стерильные шприцы с одноразовыми фильтрами, однако возможно использование и оборудования с многоразовыми фильтрами. Одноразовые фильтры можно использовать сразу же, в то время как многоразовые фильтры требуют предварительной очистки.

При использовании метода фильтрации следует обратить внимание на то, что мембранные фильтры, изготовленные из переплетенных органических нитей или перфорированных поликарбонатных листов, иногда имеют отверстия большего диаметра, чем номинальный размер пор. Например, установлено, что фильтры с размером пор 0,2 мкм имеют многочисленные дефекты поверхности, обнаруживаемые с помощью электронного микроскопа, и в фильтрате обнаруживаются водоросли и посторонние частицы диаметром несколько микрометров. Маленькие гетеротрофные флагелляты могут сжиматься при прохождении пор, которые намного меньше обычного размера их клеток (Kawachi, Noël, 2005).

4.4.5. Стерилизация с помощью микроволновой печи

Стерилизация при помощи микроволновой печи быстрее, чем пароварение или сухая стерилизация. Микроволновая печь производит тепло двух видов: ионная поляризация и дипольная ротация. На практике, клетки скорее погибают от пара во время кипения, чем от воздействия микроволн, в настоящее время негативное воздействие микроволн на живые организмы еще не доказано (Keller et al., 1988). Стерилизация в микроволновой печи эффективна и нетоксична. Рекомендуется использовать микроволновую печь, которая снабжена вращающейся подставкой и имеет мощность до 700 Вт.

Существует несколько методик стерилизации жидкостей в микроволновой печи. Например, при стерилизации 1-1,5 л морской воды, микроводоросли погибают в течение 5 мин, бактерии – 8 мин, грибы – 10 мин. (Keller et al., 1988). В настоящее время микроволновые печи имеют большую мощность, поэтому время стерилизации будет зависеть от мощности прибора. Кроме того, эффективность микроволновой печи уменьшается с течением времени, и поэтому при стерилизации в старых печах этот процесс нужно проводить дольше. Существует и методика быстрой стерилизации в течение 5 мин (стерилизация в течение 1,2 и 2 минут с интервалами в 30 секунд) при 600 Вт (Leal et al., 1999).

Для стерилизации стеклянной посуды необходимо налить небольшой объем дистиллированной воды в посуду и стерилизовать в микроволновой

печи в течение 20 минут при 600Вт (Boye, van den Berg, 2000). После стерилизации воду нужно вылить в ламинарном шкафу с соблюдением правил стерильности. Если в посуду не добавляется вода, необходима стерилизация в течение 45 минут или дольше для уничтожения спор бактерий, что аналогично разнице времени стерилизации в автоклаве и сухожаровом шкафу (Kawachi, Noël, 2005).

4.4.6. Стерилизация с помощью ультрафиолетового облучения

Хотя х-лучи и γ -лучи (ионизирующая или ультрафиолетовая (УФ) радиация) широко используются в промышленных целях (например, для стерилизации пластиковой посуды), эти методы можно также использовать и в лабораторных условиях. УФ-радиация подходит для использования в лаборатории, включая стерилизацию ламинарных боксов и рабочих поверхностей. УФ-радиация опасна для человека (особенно для глаз), и необходимо избегать попадания этих лучей на тело. Вдобавок, УФ-радиация образует озон, что также нежелательно для человека. УФ-радиация имеет первичный летальный эффект при 260нм и способствует образованию ковалентных связей в тимине ДНК. Эти димеры тимина вызывают ошибки при удвоении ДНК и приводят к возникновению потенциально летальных мутаций.

Ультрафиолетовые лампы испускают излучение с длиной волны от 240 до 280нм. Энергия зависит от размера лампы и колеблется от 40 до 40000мкВт \times с/см². Выбор лампы зависит от ее назначения. УФ-радиация не проникает через обычное стекло, поэтому для стерилизации жидкостей, особенно в больших объемах, рекомендуется использовать водостойкие пригодные для использования под водой лампы. Стеклоянную посуду можно заменить на кварцевую, которая пропускает УФ-лучи, однако такая посуда стоит очень дорого. Кроме того, кварцевое стекло легко царапается, что снижает его эффективность. При стерилизации больших объемов воды следует помнить, что ультрафиолетовый свет не проходит сквозь воду одинаково – он абсорбируется, и его эффективность снижается по мере удаления от лампы. Постоянное перемешивание воды и достаточное время экспозиции позволяет решить эту проблему, однако если организмы прикрепляются к внутренней части емкости, последующая стерилизация может быть неэффективной без использования более мощной лампы и более длительного времени экспозиции (Kawachi, Noël, 2005).

4.4.7. Стерилизация с использованием отбеливателя

Отбеливатель (гипохлорит натрия) широко используется в аквакультуре водорослей, где требуется стерилизация больших объемов воды. Хотя добавление небольшого количества отбеливателя не может убить все цисты, это позволяет избавиться от большинства организмов. Количество до-

бавляемого отбеливателя зависит от органических веществ в воде. Обычно добавляют 1-5мл отбеливателя в промышленной концентрации на 1л воды, и после легкого перемешивания воде дают отстояться в течение нескольких часов. При отстаивании в течение более короткого промежутка необходимо добавлять больше отбеливателя. Раствор не следует выставлять на прямой солнечный свет. После окончания обработки раствор нейтрализуют тиосульфатом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$). Берут 50г тиосульфата натрия, растворяют в 1л воды, затем 1мл этого раствора добавляют к 4мл используемого отбеливателя (Kawachi, Noël, 2005).

4.4.8. Стерилизация с помощью оксида этилена

Раньше неустойчивые к нагреванию материалы (пластики и каучуки) стерилизовали с помощью оксида этилена. Однако в этом случае проблемы возникали после стерилизации, так как оставались следы этого химиката, часто убивающие живые клетки. Постепенно этот способ стерилизации вышел из употребления. В настоящее время используются устойчивые к нагреванию или одноразовые стерильные материалы (Kawachi, Noël, 2005).

4.5. Хранение стерилизованных материалов

Вне зависимости от способа стерилизации, хранение однажды стерилизованных материалов представляет определенные трудности. Питательные среды обычно хранят в холодильнике. Что же касается хранения лабораторных материалов, то они после охлаждения должны храниться в чистых контейнерах, не содержащих пыли. Следует помнить, что внешняя поверхность контейнера (металлической коробки, пакета и т.д.) будет загрязненной. Для предотвращения загрязнения стерильного содержимого, контейнер должен быть покрыт алюминиевой фольгой, либо контейнер необходимо обработать этанолом снаружи или пропустить через пламя горелки (при небольших размерах емкостей или предметов) (Kawachi, Noël, 2005).

4.6. Процедуры пересева культур в стерильных условиях

4.6.1. Стерильные комнаты

Лучшим местом для манипуляций с культурами и стерильными материалами является ламинарный бокс с вытяжкой, размещенный в небольшой закрытой комнате. Если нет такого бокса, для пересевов можно использовать небольшое по размерам изолированное помещение. Эту комнату необходимо оборудовать ультрафиолетовой лампой и бунзеновской горелкой (или спиртовкой). Если нет возможности использовать комнату, то можно работать в обычной лаборатории, соблюдая меры стерильности. Независимо от оснащенности стерильного помещения, источником загряз-

нения может быть воздух, рабочая поверхность, внутренние поверхности сосудов, контейнеров и т.д. Поэтому все манипуляции следует проводить так, чтобы уменьшить риск загрязнения. В Соединенных Штатах перед началом работы в воздухе распыляют лизол (Kawachi, Noël, 2005). Этот спрей нейтрализует коллоидные частицы в воздухе, такие как пыль и споры, позволяя им осесть на поверхность стола или пола, после чего все поверхности протирают 70% этанолом.

Рабочее место и материалы следует располагать таким образом, чтобы уменьшить циркуляцию воздуха (рис. 7). Исследователь должен совершать как можно меньше движений, все его движения должны быть медленными. Следует избегать перекрещивания рук и хаотичных движений с пипетками в воздухе. Наличие ламинарного бокс с вытяжкой позволяет быть уверенным в том, что воздушная пыль не проникнет на рабочее место, однако следует постоянно проверять состояние фильтров бокса. Если фильтры загрязняются, то бокс становится потенциальным источником загрязнения (Kawachi, Noël, 2005).

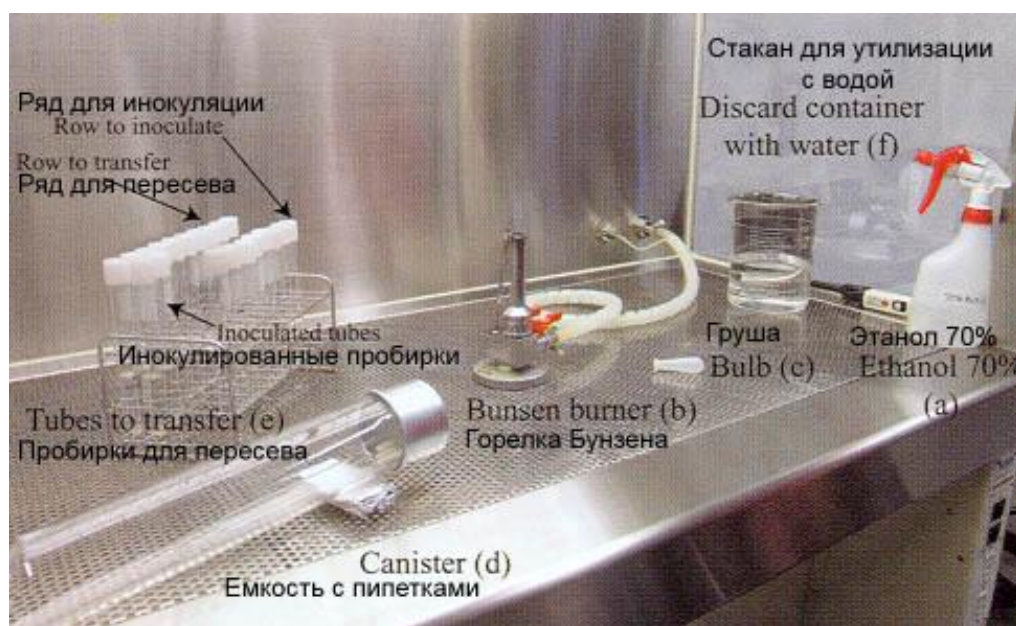


Рис. 7. Ламинарный бокс с горелкой Бунзена и лабораторными материалами, организованный для работы праворукого человека (Kawachi, Noël, 2005). Порядок расположения материалов обозначен буквами от (а) до (f). Пробирки расположены в определенном порядке для облегчения работы и избежания ошибок при пересеве

Перед работой необходимо проверить состояние стерильных материалов, их не следует использовать, если нет уверенности в их чистоте. Обработать все рабочее место 70% этанолом. Перед работой следует надеть латексные перчатки, которые нужно часто менять, или протирать руки 70% этанолом. Рукава одежды являются основным источником загряз-

нения, поэтому рукава нужно закатать и обработать открытые участки кожи рук 70% этанолом. В качестве альтернативы можно использовать чистую одежду, обработанную УФ-лампой, которую не использовали за пределами комнаты для пересевов. Горелку Бунзена (или спиртовку) нужно поместить в центр ламинарного бокса, чтобы все операции проводились в пределах зоны с диаметром от пламени в 40 см (рис. 7). Сосуд для использованных пипеток, одноразовых наконечников и других предметов нужно поместить справа от человека (слева, если работает левша), чтобы уменьшить риск загрязнения. После организации рабочего места нужно зажечь горелку (спиртовку) и еще раз обработать руки 70% этанолом, избегая воспламенения спирта. Если стерильное оборудование (например, пипетка или одноразовый наконечник) случайно коснется внешних поверхностей контейнера или другой склянки, его следует выбросить и заменить новым стерильным изделием. Содержимое стеклянных сосудов не следует наливать прямо в другой сосуд, если внешнюю поверхность около отверстия невозможно обработать пламенем. Ни при каких обстоятельствах нельзя повторно использовать одну и ту же пипетку! Таким же образом порцию стерильной среды, которая остается в пипетке после манипуляций, следует вылить в сосуд для утилизации, не допуская ее разбрызгивания и попадания микроскопических капель в стерильную среду (Kawachi, Noël, 2005).

4.6.2. Пересадка жидких культур водорослей

В настоящее время существует множество вариаций методики пересева культур в новую среду. Представленный в данном пособии метод прост и позволяет без особых усилий соблюдать необходимую стерильность при работе. Этот способ предполагает наличие ламинарного бокса с вытяжкой, в случае его отсутствия ряд этапов можно пропустить. Кроме того, описанный метод подразумевает использование многоразовых стеклянных пипеток, при использовании одноразовых пипеток или наконечников необходимы небольшие модификации этого метода. Наконец, рекомендации разработаны для праворуких людей, леворукие люди должны внести небольшие коррективы (Kawachi, Noël, 2005).

Подготовительный этап.

1. Надеть защитную одежду, стерилизованную в УФ-лучах. Если эта одежда использовалась вне комнаты для пересевов, ее надо занести в комнату и включить УФ-лампу.
2. Выключить УФ-лампу, открыть дверь, стараясь широко не распахивать, медленно войти в комнату и осторожно закрыть дверь.
3. Включить вытяжку в ламинарном шкафу, если в боксе есть газовый кран, открыть его, однако кран горелки Бунзена должен быть закрыт.
4. Протереть рабочую поверхность 70% этанолом.

5. Поместить бунзеновскую горелку в центр.
6. Поставить коробку со стерильными одноразовыми или многоразовыми пипетками слева как можно дальше (рис. 7).
7. Поставить склянки, колбы Эрленмейера, пробирки слева (на вторую позицию в хронологическом порядке использования в соответствии с рис. 7) на периферию в радиусе 40см от горелки Бунзена.
8. Положить грушу для пипеток справа от горелки Бунзена. Необходимо регулярно обрабатывать внутреннюю часть груши 70% этанолом и промывать внутреннюю часть отверстия. Никогда не следует использовать грушу, которую применяли для работы с химикатами (например, осмием, глутаральдегидом).
9. Поставить емкость для использованных пипеток на максимальное расстояние от себя справа (вне радиуса 40см от горелки).
10. Проверить наличие этикеток на всех емкостях для пересева.
11. После организации рабочего места необходимо открыть кран и зажечь горелку Бунзена. Обработать руки 70% этанолом или надеть стерильные перчатки. Манипуляции проводить внутри зоны на удалении 40см от горелки.

Процедура пересева.

- 12.левой рукой нужно взять коробку с пипетками и поднести ее к горелке Бунзена на расстояние 20см. Открыть крышку правой рукой, держа крышку между ладонью и безымянным и указательным пальцами (рис. 8а). Если крышка слишком велика для этих манипуляций, поднести крышку к горелке и подержать в пламени.
- 13.левой рукой слегка встряхнуть коробку таким образом, чтобы одна из пипеток вышла из коробки на несколько сантиметров (рис. 8б).
- 14.правой рукой взять пипетку большим, указательным и средним пальцами, вытащить из коробки медленным движением (рис. 8с). Наконечник пипетки не должен касаться никаких поверхностей.
- 15.Держать свои руки вблизи горелки Бунзена, работать с пипеткой и открывать сосуд лучше всего на расстоянии 20см от горелки.
- 16.Закрывать коробку крышкой, стараясь не допустить касания пипеток поверхностей (рис. 8д). Для предотвращения загрязнения во время повторных посевов культур, рекомендуется держать коробку с пипетками открытой на расстоянии 40см от горелки и доставать пипетки при помощи металлического пинцета, стерилизуемого в пламени перед каждой манипуляцией. В этом случае следует использовать все пипетки в коробке, или снова стерилизовать их перед следующим использованием.
- 17.левой рукой переместить коробку с пипетками в ее обычное положение.
- 18.левой рукой достать пипетку большим и указательным пальцами за конец, закрытый ватной пробкой и поднести к пламени (рис. 9а).
- 19.правой рукой взять грушу.

20. Надеть грушу на пипетку (рис. 9b).

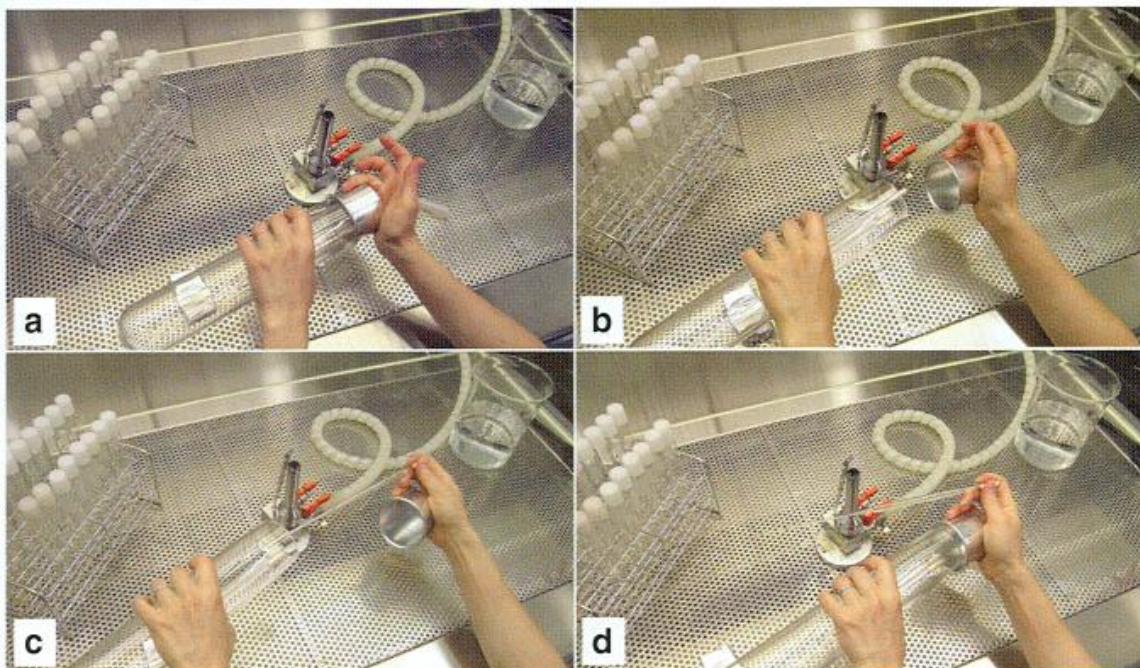


Рис. 8. Извлечение пипетки Пастера из емкости для хранения (Kawachi, Noël, 2005). Крышку емкости нужно держать в правой руке между ладонью и двумя другими пальцами. Все манипуляции нужно производить вблизи горелки Бунзена. а – открывание крышки емкости; б – «вытряхивание» пипетки из емкости; с – извлечение пипетки; д – закрывание емкости крышкой

21. Стерилизацию пипетки в пламене проводить не обязательно, однако, если это сделали, необходимо остудить пипетку в небольшом количестве стерильной среды.

22. Взять пипетку правой рукой возле груши (рис. 9с), а левой рукой – сосуд с культурой.

23. Переместить сосуд с культурой в правую руку, и с помощью ладони и мизинца правой руки открыть крышку сосуда, держа пипетку (рис. 10а). Пипетку надо держать вблизи горелки и не касаться никаких поверхностей.

24.левой рукой осторожно поднести отверстие пробирки к пламени и медленно вращать пробирку под углом 45° , стараясь не дышать в сторону сосуда с водорослями (рис. 10b). Не нагревать пластиковую посуду!

25.левой рукой медленно переместить пробирку обратно от пламени, держа под углом 45° для уменьшения загрязнения.

26. Медленно опустить наконечник пипетки в жидкость, стараясь не задевать стенок пробирки.

27. Медленно набрать суспензию клеток в пипетку с помощью груши, следя за тем, чтобы жидкость не доходила до ватной пробки, закрывающей пипетку (рис. 10с). Набрать только необходимый объем суспензии водорослей, излишки необходимо вылить. Для уменьшения риска разливания культуры после забора клеток груша должна принять первоначальное расширенное положение.

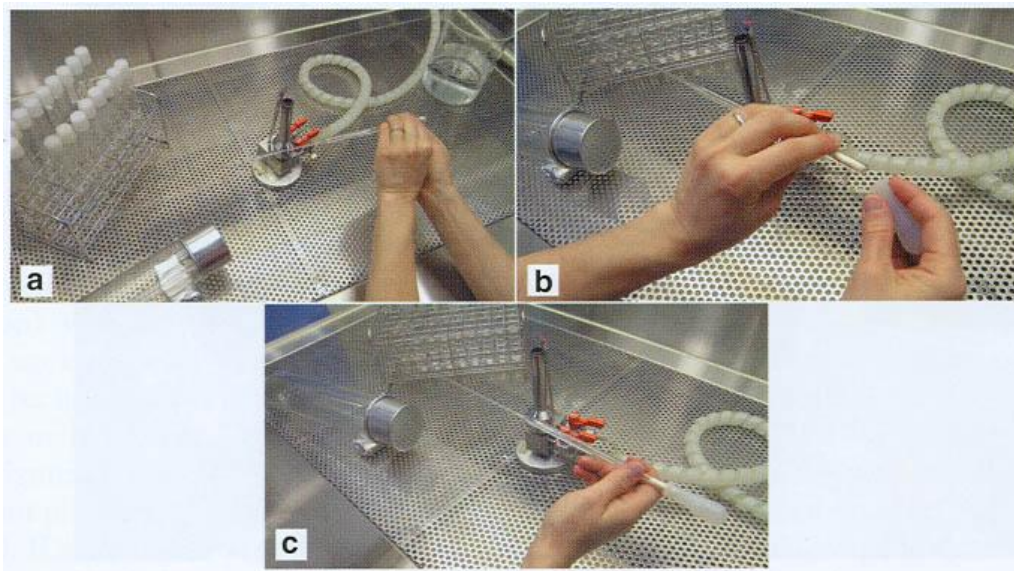


Рис. 9. Работа с пипеткой Пастера (Kawachi, Noël, 2005): а – перемещение пипетки из правой в левую руку; б – надевание груши на пипетку. Кончик пипетки должен находиться вблизи горелки Бунзена. Ватная пробка предохраняет загрязнение пипетки со стороны груши; с – держа пипетку правой рукой, медленно переместите в левую руку (ее не видно) для отбора культуры водорослей

28. После забора необходимого количества суспензии клеток пипетку следует медленно вынуть из пробирки, избегая контакта со стенками.

29. Повернуть пипетку горизонтально без надавливания на грушу и держать ее на расстоянии 20см от горелки Бунзена.

30. Снова поднести горлышко пробирки к пламени, повернуть (рис. 10d), не касаясь пипеткой никаких поверхностей.

31.левой рукой медленно поднести пробирку к пробке, которую следует держать мизинцем и ладонью правой руки (рис. 10e). Более крупные крышки (например, пробки колб Эрленмейера), которые невозможно держать во время манипуляций, необходимо положить на рабочую поверхность и подержать в пламени перед тем, как закрыть сосуд.

32. Закрыть пробирку крышкой, всегда помня о том, что пипетка не должна касаться никаких предметов и поверхностей. Не подносить пипетку близко к пламени, так как высокая температура может убить клетки.

33. Поставить закрытую пробирку на прежнее место. Лучше всего ставить пробирку с культурой на новое место, чтобы не поместить в нее культуру второй раз. Если пробирки находятся в штативе, необходимо разделять пробирки со средой и пробирки с инокулятом свободным рядом (рис. 7).

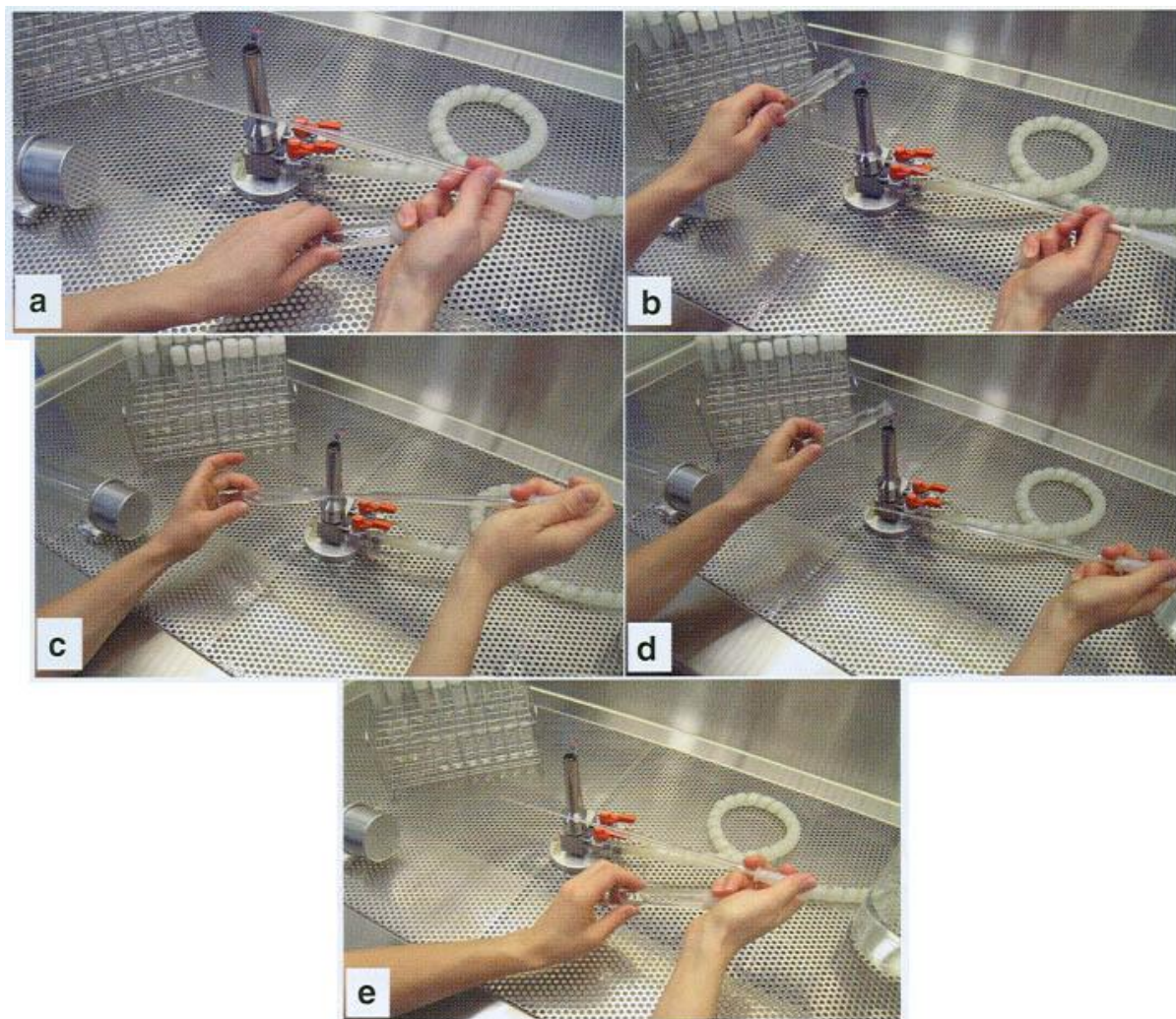


Рис. 10. Методика работы с пробиркой во время пересева (Kawachi, Noël, 2005). Пробку следует держать между ладонью и маленьким пальцем во время асептической работы: а – открывание пробки; б – обработка горлышка пробирки в пламени горелки; с – отбор суспензии клеток для пересева; д – повторная обработка горлышка пробирки в пламени; е – закрывание пробирки пробкой

34. Медленно поднести левую руку к сосуду, в который будет вноситься суспензия водорослей.

35. Используя те же процедуры, которые были описаны выше, открыть новую пробирку, поднести горлышко к пламени и опустить пипетку в новую пробирку, не касаясь стенок.

36. Медленно вылить суспензию водорослей в пробирку и осторожно вытащить пипетку. Если кончик пипетки находится ниже уровня жидкости, следует избегать появления пузырьков.

37. Поднести горлышко сосуда к пламени и закрыть крышку так, как было описано выше, соблюдая меры стерильности.

38. Поместить пробирку с водорослями, закрытую крышкой, в штатив.

39. Выбросить использованную пипетку в специальный контейнер, соблюдая меры предосторожности для предотвращения разбрызгивания суспензии клеток на рабочую поверхность. Если разбрызгивание все-таки произошло, вытереть жидкость салфеткой, обработать 70% этанолом и снова протереть поверхность чистой салфеткой. Поменять перчатки или обработать руки 70% этанолом.

40. Поставить пипетку в контейнер для использованных пипеток. Ладонью и указательным пальцем свободной левой руки взять пипетку за конец с ватной пробкой, и осторожно удалить грушу с пипетки правой рукой (рис. 11a).

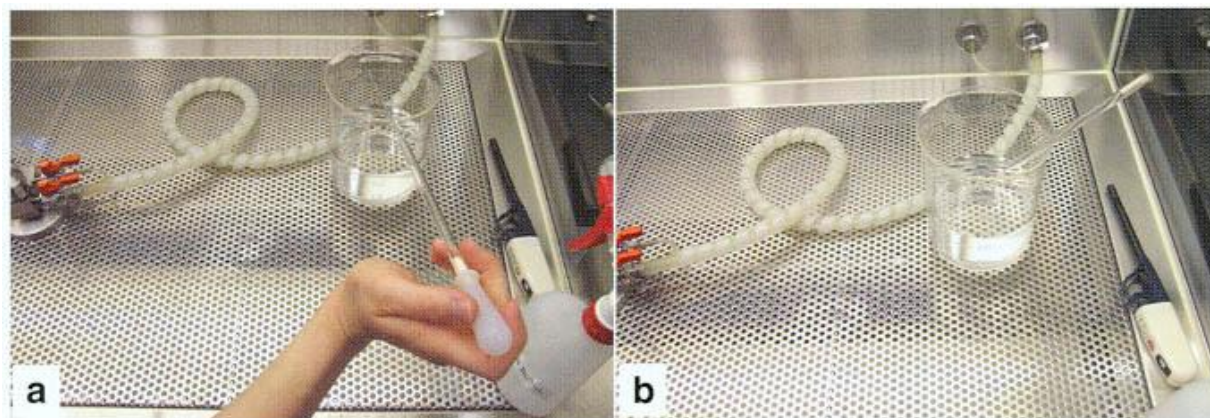


Рис. 11. Удаление остатков жидкости в стакан для утилизации (Kawachi, Noël, 2005): а - грушу следует удалять только тогда, когда пипетка находится над стаканом для предотвращения попадания жидкости на рабочую поверхность; б – стакан для утилизации должен быть устойчивым, чтобы при помещении в него большого количества пипеток он не опрокинулся; в стакане должно быть достаточное количество воды для его устойчивости и для того, чтобы кончики пипеток находились в жидкости.

41.левой рукой поместить пипетку в контейнер, следя за тем, чтобы наконечник был полностью погружен в воду (рис. 11b). Вернуть грушу в нормальное положение. Рабочее место должно быть готово к следующему процессу инокуляции.

42. После окончания пересева выключить горелку Бунзена, убрать все материалы с рабочего места, и протереть все поверхности 70% этанолом.

43. Закрывать основной газовый кран, если он есть. Выключить систему вентиляции и включить УФ-лампу. Выйти из комнаты, осторожно открывая и закрывая дверь.

44. Снять защитную одежду и положить в специальный шкаф для стерилизации.

45. Лучше всего иметь специальную чистую обувь для пересевов. Перед входом в стерильную комнату для пересевов нужно положить коврик для протираания обуви. Грязь с обуви является одним из основных источников загрязнения.

46. Перед допуском к работе необходимо проводить инструктаж и объяснять все правила соблюдения стерильности. Только после этого исследователя можно допускать к пересеву культур (Kawachi, Noël, 2005).

4.6.3. Пересадка агаровых культур

Процедура пересадки агаровых культур имеет ряд особенностей, но в целом характеризуется большим сходством с пересадкой жидких культур:

1-5. Эти пункты аналогичны методике пересадки жидких культур.

6. Положить микробиологическую петлю возле горелки Бунзена. Поставить пробирки или чашки Петри слева на периферию радиуса 40см от горелки.

7. После организации рабочего места повернуть газовый кран и зажечь горелку Бунзена. Надеть стерильные перчатки или протереть руки 70% этанолом. С этого момента начинаются стерильные манипуляции, поэтому нужно работать внутри радиуса 40см вокруг горелки Бунзена.

8. Нагреть микробиологическую петлю в синей части пламени горелки Бунзена до тех пор, пока металл не раскалится (рис. 12a).

9. Остудить петлю внутри зоны 20см от горелки Бунзена (рис. 12b).

10.левой рукой переместить пробирку с культурой по направлению горелки внутрь зоны 2см от горелки.

11. При работе с пробиркой следуйте инструкции для пересадки жидких культур (см. п. 23-25). При работе с чашками Петри открыть крышку левой рукой под углом 45°, избегая касания внутренней части крышки (рис. 12c).

12. Медленно опустить петлю в пробирку и осуществить забор не большого количества культуры, не царапая агар (рис. 12d).

13. Закройте крышку пробирки или чашки Петри крышкой (см. п. 30-32 инструкции по пересеву жидких культур).

14. Медленно поднести свою левую руку к сосуду, в который будет пересаживаться культура.

15. Используя процедуру, описанную выше, открыть новый сосуд и аккуратно пересадить культуру на поверхность агара, не царапая ее. Использовать подходящую технику пересева (например, горизонтальные зигзагообразные движения для пробирки или метод квадратов для чашки Петри). В любом случае, конец микробиологической петли не должен касаться стенок пробирки или чашки Петри.

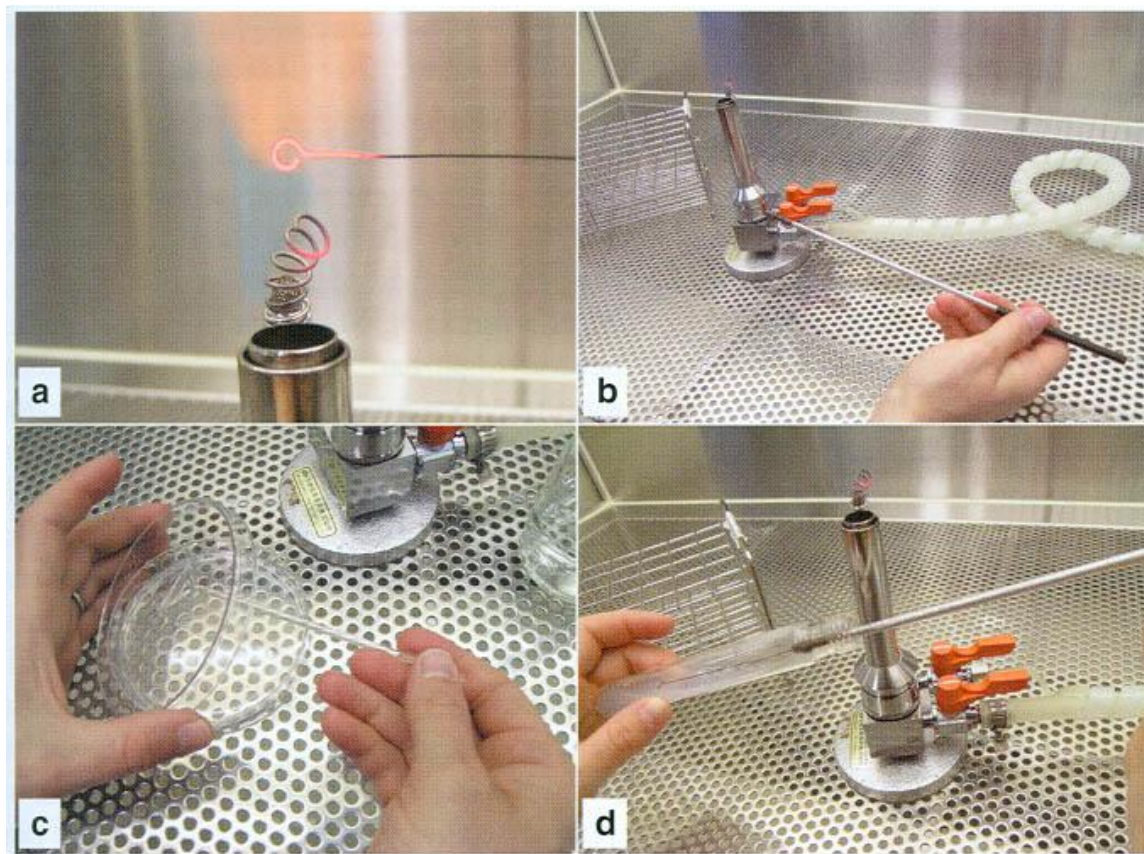


Рис. 12. Пересев культур водорослей на агаризованные среды (Kawachi, Noël, 2005): а – нагревание платиновой петли в пламени горелки Бунзена; б – охлаждение микробиологической петли вблизи горелки Бунзена; с – открывание чашки Петри под углом 45°; d – посев культуры в пробирку, при этом следует избегать контакта петли со стенками пробирки, пробирку следует держать под углом 45° к поверхности

16. После пересева горлышко пробирки нагреть в пламени горелки и закрыть крышкой так, как описано выше, используя меры стерильности. При пересеве в чашки Петри закрыть крышку чашки Петри очень осторожно.

17. Нагреть конец микробиологической петли в синей части пламени до тех пор, пока металл не накалится. После остывания петли внутри зоны 20 см от горелки петля готова к следующему пересеву.

18. Далее необходимо следовать инструкциям, приведенным в методике посева жидких культур (см. п. 42-46) (Kawachi, Noël, 2005).

4.7. Оценка стерильности

Несмотря на соблюдение правил стерильности, не всегда удается избежать загрязнения. Поэтому полезно использовать тесты на стерильность для оценки условий. Бактерии и грибы растут на различных питательных агарах и бульонах, хотя необходимо отметить, что не все бактерии или грибы растут на любых специфических органических средах. Для проведения общего теста на стерильность можно использовать 0,1% пептонный агар. Для достижения лучшего результата пептон следует растворить в питательной среде перед добавлением дистиллированной воды. С целью выявления грибного загрязнения лучше подходит экстракт солода, так как на нем грибы растут лучше, чем на пептоне. Для специфических нужд, например, для метиламинотрофных бактерий, предпочтительным субстратом является метиламин.

Во время проведения теста для оценки воздушного загрязнения рабочего места серию питательных сред выставляют на открытый воздух на определенное время. Например, чашки Петри со стерильным пептонным агаром могут быть выставлены на 1, 5, 15, 30 и 60 минут. Сначала чашки Петри открывают на время (например, на 1 минуту) и потом закрывают. Затем чашки инкубируют в течение 1-3 дней, потом подсчитывают число колоний бактерий или грибов. Ламинарный бокс с вентиляцией можно считать стерильным, если на чашке Петри, открытой в нем в течение 1 часа, не обнаруживается никаких разрастаний. Для бокса, стоящего в маленькой комнате, при 15-30-минутной экспозиции в чашке допускается появление 1-2 колоний. Если после кратковременного открывания чашки на поверхности среды появляется многочисленные колонии, то окружающая среда является очень загрязненной, а процедуры стерилизации – неудачными. Таким же образом можно проводить тест на загрязненность с использованием пробирок с бульоном. Однако при этом невозможно подсчитать число колоний, поэтому при появлении признаков бактериального или грибного роста пробирка считается загрязненной. Если при экспозиции 10 пробирок в течение тех же интервалов времени, которые используются при оценке загрязненности с помощью агаровых чашек, ни в одной из 10 пробирок не наблюдается следов загрязнения, то среда считается стерильной. Если с момента проведения теста на загрязнение и началом работы условия среды изменяются, то невозможно гарантировать стерильность ра-

бочего места. Можно привести примеры, когда стерильность среды может измениться. Если тест на загрязнение проводился в условиях полевой станции одним человеком, а посев проводился в лаборатории, где присутствовало несколько человек, дополнительная активность может увеличить загрязненность. Загрязнение рабочего места может также увеличиться, если перед посевом проводили уборку помещения с помощью пылесоса, что способствует распространению спор в воздухе.

Существуют многочисленные вариации тестов на загрязненность в зависимости от среды, витаминов, маточных растворов, пипеток и т.д. Например, если с маточными растворами проводят многочисленные манипуляции при приготовлении, это может способствовать загрязнению среды. Стерильность маточных растворов можно проверить в продуваемом ламинарном боксе. Если среда окажется загрязненной, то ее следует вылить. В тех случаях, когда при приготовлении среды используется метод фильтрации, эту среду необходимо протестировать на загрязненность, чтобы проверить эффективность фильтрации. Позитивный бактериальный рост является свидетельством того, что бактерии прошли через фильтр.

Эти простые тесты с бесконечным числом модификаций могут использоваться для оценки стерильности. Если планируется работа с водорослями после проведения теста, необходимо соблюдать те же условия стерильности, что и во время проведения теста. Тесты не должны рассматриваться как абсолютные показатели стерильности, но они отражают состояние окружающей среды при отсутствии других возможностей оценки.

Следует отметить, что методики стерилизации могут зависеть от лаборатории и каждого исследователя. Однако вне зависимости от используемой методики необходимо строго соблюдать требования стерильности, без которых невозможно культивирование водорослей (Kawachi, Noël, 2005).

Контрольные вопросы

1. Что означает термин «стерилизация»?
2. Какие способы стерилизации вам известны?
3. В чем отличие автоклавирования от других способов стерилизации?
4. В каких случаях применяется стерилизация фильтрацией?
5. Чем отличаются между собой пастеризация и тиндализация?
6. Какое оборудование необходимо для обеспечения стерильности пересева?
7. Укажите основные этапы пересева водорослей в жидкую и на агаризованную среду.
8. Как оценить степень стерильности рабочего места?

ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ В КУЛЬТУРУ

5.1. Общие понятия о методах выделения водорослей

Выделение микроводорослей в культуру с помощью традиционных методов является хорошо изученной процедурой. Впервые методы выделения водорослей были описаны еще в конце XIX века М.Бейеринком (M.Beijerinck) и П.Миквелом (P.Miquel). Все водоросли условно можно разделить на две группы. В первую группу входят виды, в английском языке часто называемые «weeds», которые легко выделяются и культивируются. Ко второй группе относятся виды, которые достаточно сложно выделяются и плохо культивируются. Поэтому не удивительно, что организмы из экстремальных и необычных местообитаний менее многочисленны в коллекциях культур, чем те, которые обитают в пресных водоемах, почвах и возле морских побережий. Целью этого раздела является описание методов выделения водорослей из различных естественных местообитаний. Более подробную информацию можно найти в следующих сводках: Küster (1907), Kufferath (1928/29), Bold (1942), Pringsheim (1946), Brunel et al. (1950), Lewin (1959), Venkataraman (1969), Stein (1973), Guillard (1995).

5.2. Факторы, влияющие на выделение водорослей

Часто первым шагом на пути к успешной изоляции водорослей из их природной среды являются комплексные данные об их среде обитания. Например, для прибрежных морских водорослей важными факторами являются температура и соленость воды. Для океанского фитопланктона, кроме этих факторов, важны качество воды и токсичность металлов. Пресноводные водоросли, отобранные в весенне-летне-осеннее время, часто менее чувствительны к температуре, но подвержены влиянию pH среды. Полярные водоросли и водоросли снега очень чувствительны к высоким температурам, в то время как протисты горячих источников чувствительны к более холодным температурам. Водоросли, обитающие в кислых или засоленных местообитаниях, требуют специальных питательных сред. Для наземных или почвенных водорослей факторы окружающей среды менее значимы.

Для успешного культивирования необходимы и знания таксономии. Для выращивания диатомовых водорослей необходим кремний, эвгленовых – аммоний, некоторые виды (например, *Chrysochromulina*) нуждаются в селене. Миксотрофные виды (например, некоторые динофлагелляты и золотистые водоросли) нуждаются в добавлении источников питания для бактерий, бесцветные фаготрофы (например, *Pfiesteria*) могут требовать эукариотических источников питания.

Следующим важным фактором, который нужно учитывать при культивировании, является уничтожение загрязнителей, особенно тех, которые могут конкурировать с нужным видом. Среди методов выделения водорослей наиболее распространенными являются изоляция с помощью разведения, изоляция отдельных клеток с помощью микропипеток, изоляция при помощи агара и др. Конечный этап выделения требует создания условий для дальнейшего роста водорослей. Иногда желаемый вид растет на начальных стадиях изоляции, но потом погибает после нескольких пересевов на свежую среду. Это является показателем того, что питательная среда лишена специфических элементов или органических веществ, недостаток которых сразу не проявляется. К сожалению, исследователь узнает об этом слишком поздно, когда оригинальный изолят уже погиб. Организм может подавляться отходами жизнедеятельности, что отравляет его среду обитания, приводя к гибели. В природе эти отходы обычно нейтрализуются другими организмами (Andersen, Kawachi, 2005).

5.3. Отбор образцов

Методы культивирования иногда являются критическими точками при проведении экспериментальных работ, так как поврежденные или мертвые клетки приводят к неудаче. Если нужный вид хорошо известен, и если его собирали и изучали ранее, исследователь будет вооружен багажом знаний, который позволит ему успешно культивировать эти водоросли.

Образцы, отобранные на глубине, могут быть чувствительны к изменению давления, света или температуры. Образцы, отобранные в чистые контейнеры и хранимые при постоянной температуре, часто обеспечивают сохранение жизнеспособности водорослей, в то время как концентрированные среды для отбора образцов оказываются непригодными. Ученый должен потратить много времени, чтобы выделить несколько клеток нужного ему вида. Наконец, если отбор проб ведется в местообитании, сведения об особенностях которого отсутствуют, или если вид неизвестен, исследователь может использовать целый комплекс методов для выделения и культивирования.

Природные образцы часто содержат мелких животных. Эти животные могут быстро поедать и уничтожать водоросли. Более крупные животные (например, коллемболы, ресничные черви и др.) и нежелательные колониальные водоросли могут быть удалены путем фильтрации. Отверстия фильтра должны пропускать водоросли и задерживать животных. Для удаления ненужных организмов эффективно проводить фильтрацию сразу же после сбора образцов. Таким же образом, если образец содержит большое количество более мелких нежелательных организмов, таких как бактерии и другие водоросли, путем фильтрации можно собрать нужные водоросли, которые остаются на поверхности фильтра.

Время является важным фактором во время выделения водорослей. Некоторые организмы быстро погибают, даже спустя один или несколько часов после сбора образцов. Выделение этих организмов должно проводиться очень быстро. Когда образцы обогащаются, некоторые виды очень быстро размножаются, но могут внезапно погибнуть. В этих случаях рекомендуется следить за состоянием культуры через 1-2 дня. Наконец, некоторые организмы, которые не обнаруживаются во время сбора образцов, появляются спустя недели или даже месяцы.

Другим аспектом фактора времени является изменение условий существования вида. Успешный рост выделенных клеток зависит от условий или состояния клеток во время сбора образцов.

Во время сбора образцов другим важным фактором является соблюдение условий стерильности. Грязная посуда, сети, фильтры и другие приспособления для отбора образцов могут содержать устойчивые стадии других организмов, особенно цисты, которые могут привести к загрязнению. Это особенно важно, если исследователь пытается собрать пробы с неизвестными организмами, потому что загрязнитель можно легко принять за вид, обитающий в естественных условиях (Andersen, Kawachi, 2005).

5.4. Оборудование и материалы

5.4.1. Микроскопы

При исследовании водорослей наиболее часто используются бинокулярная лупа и инвертированный микроскоп, хотя комбинированные микроскопы также используются. В хорошо оборудованной лаборатории могут использоваться все виды оптических приборов, каждый для своих целей. Бинокулярная лупа должна иметь хорошие оптические линзы, лучше всего с увеличением по крайней мере до 80×. Освещение, возможно, является наиболее важным аспектом при работе с бинокулярной лупой. Трансмиссионная иллюминация и иллюминация темного поля в этом случае дают хороший результат. Освещение по методу темного поля лучше трансмиссионного света, так как позволяет выделять более мелкие клетки. Подсветка Шотта с оптико-волоконным источником света и освещением темного поля является превосходным дополнительным модулем. Крошечные клетки, пылинки и бактерии ярко освещаются на темном фоне, и видны так же, как и при большом увеличении. Свет, пропущенный через флуоресцентную лампу или исходящий от другого источника света, тоже подходит, если зеркало предметного столика приспособлено к вращению во всех направлениях для улавливания света.

Инвертированный микроскоп должен иметь конденсор с большим рабочим расстоянием для обеспечения легкого доступа при использовании микропипетки. Инвертированные световые микроскопы, особенно послед-

ние модели, имеют преимущества для легкой изоляции и наблюдения, обеспечивая детальное изображение нужных объектов. К сожалению, микроскопы, произведенные до 1990 года, плохо подходят для этих целей. Наиболее часто используются оптические линзы с увеличением 4×, 10×, 20× и 40×. При работе с инвертированным микроскопом могут использоваться разные виды чашек или стекол, но этот микроскоп превосходит другие микроскопы по легкости работы с пластиковыми планшетами. Поэтому дизайн рабочего столика крайне важен для работы. Обогащенные культуры в пластиковых планшетах («multiwell plates») и изоляты одиночных клеток можно эффективно изучить с помощью инвертированного микроскопа; клетки могут быть изолированы прямо из гнезд.

Инвертированный микроскоп с флуоресцентным освещением является хорошим инструментом для определения и выделения цист из осевших образцов, поскольку клеточные стенки и хлорофилл могут обеспечивать флуоресцентный сигнал. Многие «цветущие» виды (например, рафидиофиты, диатомовые, динофлагелляты) были выделены в культуру именно путем изоляции их цист из осадков (Andersen et al., 1995).

Комбинированные микроскопы могут быть более сложны в эксплуатации, чем бинокулярная лупа и инвертированный микроскоп. Рабочее расстояние между линзами объектива и образцом у них мало, что делает сложным отбор клеток с помощью микропипетки. Кроме того, многие составные микроскопы переворачивают изображение, затрудняя процесс выделения. Но на таких моделях могут устанавливаться реверсные призмы, которые позволяют облегчить работу. Существует много разных типов комбинированных микроскопов, но даже самые простые микроскопы, используемые для образовательных целей, имеют достаточное рабочее расстояние, позволяющее провести процедуру выделения водорослей (30мм для объективов с увеличением 4×, 8мм для линз 10× и 3мм для линз 20×, Olympus CH-2). Они имеют такую же разрешающую способность, как и инвертированные световые микроскопы, или даже лучше. Более того, простые комбинированные микроскопы популярнее и дешевле инвертированных микроскопов. Простая структура комбинированного микроскопа делает установку и разборку достаточно легкой, что является важным преимуществом во время полевых экспедиций. Если используется линза для водной иммерсии с увеличением 40×, препарат можно смотреть на большом увеличении без покровного стекла. После того, как положение клетки определено, для выделения водоросли может быть использована линза для маленького увеличения.

Комбинированный микроскоп может быть также очень полезным для проверки выделения одной клетки. Например, если крошечная клетка была выделена и помещена в стерильную каплю на предметное стекло с помощью бинокулярной лупы, потом ее можно изучить при

гораздо большем увеличении на комбинированном микроскопе. В этом случае комбинированный микроскоп позволяет исследователю различить несколько похожих типов клеток, а также проверить наличие клетки-загрязнителя. Фазово-контрастный микроскоп также может быть полезен для определения загрязнителя. Например, объективы 10× и 20× микроскопа Olympus CH-2 дают псевдо изображение темного поля, когда свет конденсора соответствует свету, предназначенному для объектива с увеличением 100× (Andersen, Kawachi, 2005).

5.4.2. Фильтры и сита

Сита, сети или фильтры используются для отделения ненужных частиц на две фракции по размеру, хотя форма частиц также влияет на процесс фильтрации.

Мембранные фильтры относятся к двум основным типам. Один тип фильтров состоит из переплетенных органических нитей (например, ацетата целлюлозы), которые имеют многочисленные отверстия (фильтры «извилистой дорожки»). Такие фильтры имеют поры диаметром менее 0,01 мкм. Кроме того, они выпускаются с размерами пор 0,45, 0,2, или 0,1 мкм. Фильтры этого типа изготавливаются при помощи собранного на электроде серебра (Flotronics, Flotronics, Inc.) и анодного алюминия (Anopore, Whatman, Inc.).

Другой тип мембранных фильтров представляет собой тонкие, плоские листы из поликарбоната, имеющие круглые отверстия примерно одинакового диаметра, расположенные случайным образом. Иногда два или три отверстия накладываются друг на друга. Данные фильтры лучше всего подходят для применения в фикологии. Второй тип фильтра предназначен для разделения фракций двух разных размеров, поэтому эти фильтры лучше соответствуют идеальному ситу, чем фильтры из органических нитей. Установлено, что используемые фильтры обоих типов с номинальным размером пор 0,2 мкм, имеют многочисленные дефекты поверхности, которые видны с помощью электронной микроскопии. Частишки грязи и водоросли размером несколько микрометров были обнаружены в фильтратах. Фильтры задерживали 92,5% частиц размером больше 0,1 мкм, но они пропускали более мелкие частицы, включая гетеротрофные бактерии и пикофитопланктон (Andersen, Kawachi, 2005).

Лучше фильтровать небольшой объем водорослей, останавливая процесс, если фильтрация замедляется. Фильтр не должен высохнуть, жидкость, собранная над поверхностью фильтра, должна быть перенесена в стерильный сосуд. Фильтры с отверстиями большего диаметра могут использоваться, если первая фильтрация дает слишком мало клеток, или используется комбинация из нескольких фильтраций. Если фильтрат содержит только один вид водорослей, отфильтрованные клетки могут быть сра-

зу же перенесены непосредственно в питательную среду. Однако в большинстве случаев для выделения водорослей необходимо применение методов, описанных ниже.

Дифференциальная фильтрация также может использоваться для удаления дрожжей или других водорослей из образцов или накопительных культур. Нити грибов хорошо удерживаются фильтрами, однако их споры обычно проходят вместе с водорослями. Для уменьшения или удаления спор грибов можно добавить небольшое количество солодового экстракта или другого органического вещества. Споры грибов могут прорасти в течение 1-2 дней, образуя нити, которые можно собрать на фильтре до их нового прорастания (Andersen, Kawachi, 2005).

5.4.3. Посуда

До недавнего времени для выделения водорослей использовалась исключительно стеклянная посуда, сейчас ее часто заменяют пластиковой, одним из преимуществ которой является стерильность, обеспечиваемая ее хранением в стерильных пакетах, готовых для использования. Другим достоинством пластика является то, что посуда для культивирования обрабатывается субстанциями, способствующими росту многих видов водорослей. При выделении водорослей используются пробирки, чашки Петри, чашки Петри, разделенные на квадраты, часовые стекла, микропипетки Пастера, капиллярные трубки, предметные стекла, колбы и другая посуда (рис. 13).

Для выделения крупных водорослей принадлежности можно стерилизовать автоклавированием, однако для выделения очень мелких и трудных для выделения клеток необходимо использовать стерилизацию сухим жаром.

Неважно, какая посуда используется для выделения водорослей (стеклянная или пластиковая), главное, чтобы она была готова к началу процесса выделения. Все материалы должны быть упакованы для сохранения стерильности, их лучше всего содержать в стерильном ящике или пакетах. Кроме посуды, перечисленной выше, исследователь должен иметь запас стерильных крышек. Для отбора почвенных образцов необходимо иметь стерильную лопаточку и стерильную установку для фильтрования. Необходимо также иметь в наличии этикетки для записей, а для запечатывания чашек Петри и пластиковых планшет – парафильм. Наконец, нужно иметь запас чистых бумажных салфеток для протирания поверхностей.



Рис. 13. Посуда и оборудование для выделения водорослей (Andersen, Kawachi, 2005): а - сита для удаления животных и крупных водорослей; б - стеклянные и пластиковые чашки Петри; с – пластиковые планшеты; d - шприц с фильтром с диаметром отверстий 0,2мкм; е –микропипетка с дозатором; f - маленькая лупа, микробиологическая петля и пинцет; g - пипетки Пастера, установленные на металлической стойке; h – стерильные пипетки Пастера в пластиковом футляре; i - стеклянная трубочка, маленький шланг и соединительная трубка; j - мундштук для соединения шлангов во время изоляции, маленький соединительный шланг для пипетки Пастера; k – большой соединительный шланг с наконечниками пластиковой пипетки на обоих концах, один конец служит мундштуком, другой поддерживает пипетку Пастера; l - мундштуки и два наконечника пластиковых пипеток, которые могут быть использованы как мундштуки; m - стеклянная планшета, которая может быть использована для споласкивания клеток во время выделения; n - маленький аппарат для фильтрования; o - стеклянные пробки как для гладких пробирок, так и пробирок с резьбой для крышек; p - гладкие стеклянные пробирки со стеклянными пробками; q - пробирки со специальной резьбой для крышек; r – стерильные пробки для пробирок; s – пластиковые пробирки с крышками, стерилизованные промышленным способом; t - стерильные колбы для культивирования с крышками.

5.4.4. Камеры для выращивания водорослей

Для выращивания водорослей широко используют специальные камеры. Особенно тщательно следует подходить к выбору источника света. В настоящее время появились флуоресцентные лампы, излучающие полный световой спектр, близкий к естественному освещению. Следует избегать слишком яркого света. Если нет возможности приобрести специальную камеру для культивирования, можно использовать северное окно. Увеличение интенсивности света часто не приводит к усилению роста одноклеточных изолятов и наносит вред культурам. Большинство культур требуют освещенности $30\text{--}60\mu\text{моль}\times\text{м}^{-2}\times\text{с}^{-1}$, однако условия освещения могут различаться для организмов из экстремальных местообитаний. Для культивирования некоторых водорослей необходима темнота. Поэтому для вновь выделенных водорослей необходимо сначала попробовать выращивание в темноте, и только тогда, когда станет ясно, что им необходим свет, водоросли следует выращивать на свету. Для выращивания большинства водорослей используют циклы свет/темнота 12:12 или 16:8, хотя некоторые зимние штаммы требуют более длительного периода темноты (например, *Naslea*) (Andersen, Kawachi, 2005).

5.5. Среда, используемые при выделении водорослей

Выбор подходящей среды является важным условием для успешного культивирования водорослей. Поэтому перед началом выделения самое пристальное внимание следует уделить выбору среды для культивирования. Одиночные клетки широко распространенных организмов (таких, как *Chlorella*, диатомовые водоросли) хорошо растут после непосредственного помещения в готовую среду. Однако многие другие водоросли погибают в питательных средах. Слишком высокая концентрация солей является основной причиной неудачных попыток культивирования многих видов. Поэтому при выделении водорослей лучше всего использовать очень разбавленные среды. Для улучшения роста через неделю после начала культивирования в разбавленную среду нужно добавить необходимое количество питательных веществ. На разных стадиях роста культура требует разного количества питательных веществ, поэтому необходимо осуществлять постоянный мониторинг состояния культуры. После достижения необходимой скорости роста культуру можно поддерживать на обычных питательных средах (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6. Стандартные методы выделения водорослей

5.6.1. Накопительные культуры

Накопительные культуры являются только первым шагом в процессе выделения чистых культур. Они являются результатом обогащения питательными веществами образца с водорослями. В качестве обогащающих субстанций используют питательные среды, почвенную вытяжку, макроэлементы (нитраты, аммоний и фосфаты), а в ряде случаев и микроэлементы. Почвенная вытяжка, возможно, является наиболее простой и самой подходящей средой при условии, что для ее приготовления использовалась почва высокого качества (Pringsheim, 1950). Для обогащения почвенной вытяжки, используемой для выращивания десмидиевых и некоторых других водорослей из кислых местообитаний, в почвенную вытяжку можно добавить сфагнум. Органические субстанции, такие как экстракт дрожжей (для обогащения витаминами), казеин (для аминокислот), могут быть добавлены в среду для выделения осмотрофных водорослей. Однако эти вещества нужно добавлять в очень низких концентрациях, так как они могут вызвать сильный рост бактерий. Бурное размножение бактерий приводит к увеличению токсичности культуры и последующей гибели водорослей. Для культивирования видов, никогда ранее не выделявшихся в культуру, исследователю иногда приходится искать новые подходы. М.Друп (M.Droop) пытался добавлять небольшие количества экстрактов разных фруктов в культуру фитопланктона при выделении *Oxurthis*. Он установил, что добавление свежесжатого лимонного сока и экстракта лимонных корок дает положительный эффект (Droop, 1966, 1971).

Для питания миксотрофных бактерий можно добавить сухое зерно риса, которое быстро удовлетворяет потребность в органических веществах. Контролируемый рост бактерий, в свою очередь, обеспечивает питание для фаготрофных водорослей (например, *Ochromonas*, *Chrysophyceae*). Зерна риса не следует автоклавировать вместе со средой, так как при этом они становятся слишком мягкими и рассыпчатыми, что способствует развитию на их поверхности некоторых патогенных микроорганизмов. В среду для культивирования можно добавлять растворимые органические вещества, такие как глюкоза, ацетат или экстракт дрожжей. Однако количество растворенных органических веществ должно быть уменьшено при выращивании хризифитовых флаголлат и других медленно растущих миксотрофов. Для выделения эвгленовых водорослей в почвенную вытяжку иногда добавляют различные семена, например, 1/4 горошины, однако в этом случае зер-

но добавляется в качестве дополнительного источника аммония и органических веществ (Andersen, Kawachi, 2005).

Природные образцы часто лишены одного или более питательных веществ, однако в природе водоросли выживают, так как жизнедеятельность бактерий и гибель организмов восполняет этот дефицит. В отобранном образце это восполнение уменьшается или совсем прекращается, и этот питательный стресс может вызвать гибель нужного вида. Таким образом, для некоторых видов небольшое обогащение может продлить жизнь здоровых клеток водорослей, необходимых для выделения культуры. Обогащение полевых образцов может быть эффективным для океанических видов, когда отбор проб ведется на корабле, особенно во время длительных путешествий. В этих случаях добавление очень небольшого количества питательной среды или раствора солей позволяет культуре сохраниться до конца путешествия. Однако обогащение может быть вредным для водорослей в зависимости от места культивирования. Например, если нужный вид является редким и не может конкурировать с более широко распространенными видами, обогащение может снизить численность этого вида. В этом случае лучше не обогащать образец. Обогащенную культуру лучше хранить в специальном шкафу для инкубации, проверяя состояние нужного вида. После получения хорошо растущей культуры выделяют этот вид. Если водоросль хорошо растет в обогащенной культуре, это облегчает её выделение.

Для подбора оптимального вещества для обогащения можно провести следующий эксперимент. В 10 пробирок нужно поместить по 10мл среды, и в каждую из пробирок добавить разные добавки (нитраты, фосфаты, силикаты, аммоний, железо и т.д.). Кроме того, можно попытаться смешать разные добавки. Затем в каждой из пробирок можно будет обнаружить различные организмы, в зависимости от того, какие добавки эти организмы предпочитают. Более того, в некоторых пробирках можно будет обнаружить организмы, не обнаруженные в среде до обогащения (Andersen, Kawachi, 2005).

В каком количестве нужно обогащающие добавки? Хотя ответ на этот вопрос зависит от образца и среды, в целом ответ будет таков: «не очень много». Максимальное количество добавки – столько же, сколько содержится в обычной среде, содержащей этот компонент, минимум – одна тысячная доля этого количества. Например, приблизительно 800 мкмоль нитрата эквивалентно его количеству, содержащемуся в среде f/2 (Guillard, 1975), которая используется для роста водоросли *Skeletonema*, но для выделения одиночных клеток кокколитофоров лучше использовать нитрат в количестве 800 наномоль. Во-вторых, добавку можно вносить постепенно (например, 800 наномоль нитрата в первый день, еще 800 наномоль на десятый и т.д.). Если биомасса водоросли удваивается, то и добавку тоже надо удваивать. Для видов с г-отбором (например, *Skeletonema*) большое количество нитрата не только

полезно, но и необходимо. Наоборот, для видов с k-отбором (океанских кокколитофоров), растущих очень медленно, требуется небольшое количество добавок. В таких условиях r-виды погибают, и спустя определенное время k-виды становятся доминантами.

Добавление аммония особенно полезно для видов, нуждающихся в этом компоненте (например, для *Aureoumbra*). В некоторых случаях (например, для *Aureococcus*) концентрации аммония свыше 20 мкмоль являются летальными. Таким образом, эти два вида водорослей, так похожие друг на друга во многих отношениях, различаются по своей потребности в питательных веществах.

Выборочное культивирование является разновидностью обогащенного культивирования для специальных целей. Если целью является выделение микроводорослей, которые могут расти при высоких концентрациях углекислого газа, тогда среды обогащают углекислым газом. Таким же образом могут быть составлены селективные культуры и по отношению к другим факторам (высокая и низкая температура, свет, соленость, pH). Специальные физические условия могут оказать сильное воздействие на рост культур. Например, некоторые бентосные диатомеи, особенно крупные *Pinnularia*, лучше развиваются при наличии осадка, по которому они могут двигаться и расти (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6.2. Выделение клеток с помощью микропипетки

Этот метод является наиболее распространенным методом выделения водорослей. В этом методе используется микропипетка Пастера или стеклянный капилляр. Для этого пипетку Пастера нагревают в пламени спиртовки, вытягивают с помощью пинцета и ломают (рис. 14).

После некоторой практики эта процедура становится быстрой и легкой. Пипетку следует держать в одной руке, в другой руке следует держать пинцет, придерживая наконечник. Пипетки следует слегка покручивать, обеспечивая ее размягчение в точке плавления. Когда нагреваемый участок расплавится, пипетку двигают в пламени и постепенно вытягивают для получения тонкой трубочки. Если пипетку растягивать быстро и делать это в пламени горелки, то получается очень тонкая ниточка. Некоторые исследователи предпочитают работать с прямыми пипетками и затем загибать у них кончик. Изогнутый кончик удобен для того, чтобы достать водоросли из глубокой емкости, но прямой наконечник удобен для того, чтобы поместить водоросль в каплю воды. После вытягивания кончика пипетки его следует остудить в течение пары секунд. Затем пинцетом нужно найти участок в самом тонком месте, лучше всего перед изгибом вниз. Затем легким движением нужно сломать пипетку и отломанный конец выбросить. Если конец пипетки получился зубчатым, надо повторить всю процедуру, так как неровный конец не позволит захватить нужную клетку.

Некоторые исследователи делают сразу несколько микропипеток, в то время как другие предпочитают делать пипетку непосредственно перед использованием. Использованную ранее пипетку можно снова использовать для получения новых стерильных наконечников, при условии, что вода не попала в пипетку при предыдущем использовании. При повторном использовании пипетки, погружаемой в морскую воду, на стенках часто образуются микроскопические корки из соли.

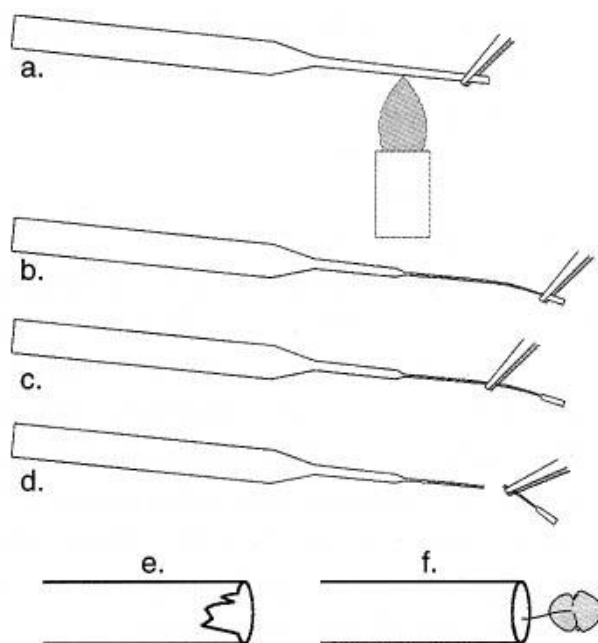


Рис. 14. Приготовление микропипетки из пипетки Пастера (Andersen, Kawachi, 2005): а - пипетку Пастера нужно держать над самой горячей частью пламени, держа ее в левой руке. В правой руке нужно держать щипцы, пипетку нужно поворачивать до тех пор, пока стекло не расплавится; б – когда стекло расплавится, пипетку нужно вытянуть над пламенем таким образом, чтобы получилась тонкая трубочка; с - затем пинцет нужно передвинуть к самому тонкому участку трубочки; d – легким движением щипцов сломать трубочку в самой тонкой части, в результате чего образуется микропипетка; е – если пипетка получилась с неровными краями, ее нужно выбросить, так как она непригодна для работы; f – если края пипетки ровные, то тогда эта пипетка пригодна для работы. Диаметр кончика пипетки должен быть больше диаметра клетки водоросли, имеющей жгутики, что уменьшит риск повреждения жгутиков во время изоляции

Целью изоляции с помощью микропипетки является захват клетки водоросли из образца, перенесение клетки без повреждения в стерильную каплю, новый захват клетки, и перенесение клетки в новую стерильную каплю. Этот процесс повторяется до тех пор, пока одиночная клетка водо-

росли, свободная от других протист, может быть перенесена в среду для культивирования (рис. 15).

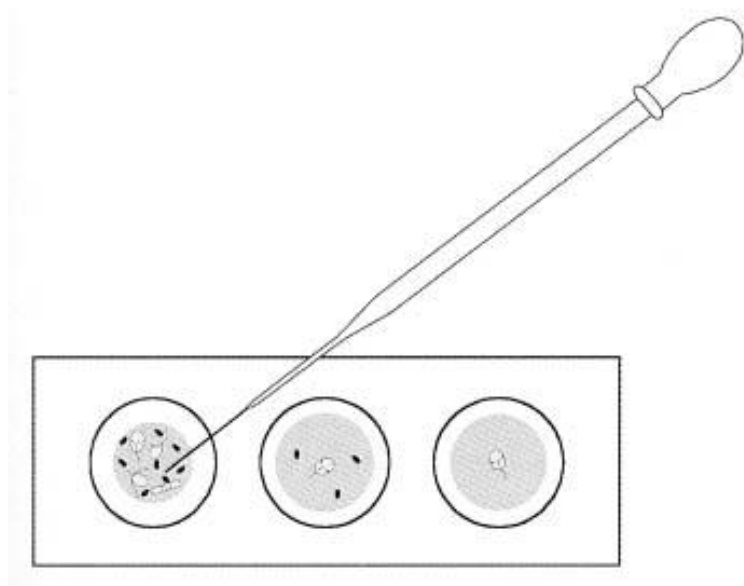


Рис. 15. Использование пипетки для удаления нежелательных организмов (Andersen, Kawachi, 2005). В левой и средней части рисунка показано, как удаляются нежелательные организмы, при этом в правой части рисунка показано, что нужный организм остается в стерильной капле

Для организмов с прочной клеточной оболочкой даже многоэтапная процедура изоляции не страшна, однако выделяя водоросли с нежной оболочкой, нужно всегда помнить об осторожности.

При выделении водорослей необходимо использовать микроскоп. Образец, содержащий нужный вид, может быть перенесен в стеклянную или пластиковую чашку, планшету или любой другой контейнер. Стерильная капля воды должна быть подготовлена до начала процесса выделения. Иногда (Lewin, 1959) рекомендуется помещать каплю на агар для уменьшения испарения, однако это не всегда необходимо. Кроме того, агар не прозрачен, как стекло или пластик, и очень мелкие клетки на нем трудно разглядеть. Стерильная капля может состоять из стерильной морской, озерной или речной воды, или питательной среды. Водоросли должны выживать в капле, не испытывая стресса. Например, пресноводные водоросли погибают в морской воде или концентрированной питательной среде.

Существует два обычных метода для захвата отдельных клеток с помощью микропипетки.

Суть первого метода заключается в следующем. Гибкий резиновый шланг нужно соединить с мундштуком и с микропипеткой или капиллярной трубкой. Лучше всего использовать тонкий шланг, так как он имеет

меньший вес, однако это потребует использования специальных соединительных трубок. Можно приобрести специальные соединительные трубки, однако в этом качестве можно использовать и части пипеток Пастера или пластиковых трубочек. Короткий конец шланга, соединенный с соединительной трубкой, обеспечивает быстрое и легкое крепление с микропипеткой. Можно использовать и более толстый шланг, однако это затруднит его использование. Толстый шланг обычно отрезают со стороны более длинного конца так, чтобы шланг можно было бы пропустить по плечам и шее для удобства при использовании. Хотя для соединения крупных шлангов можно использовать различные устройства для соединения, очень хорошо подходит наконечник для 1000мл пластиковой пипетки.

Исследователь помещает небольшое количество стерильной воды в микропипетку. Затем нужно поместить конец микропипетки рядом с нужной водорослью и втянуть каплю ртом для того, чтобы водоросль попала в микропипетку. После успешного захвата нужной клетки, конец пипетки нужно переместить в стерильную каплю, затем в следующую каплю и так далее. Эти операции нужно выполнять с осторожностью, чтобы не повредить клетку.

Согласно другой методике конец микропипетки может быть помещен в стерильную каплю таким образом, что в результате капиллярной силы вода попадет в микропипетку. Если сухую пипетку погрузить в образец (например, без погружения наконечника в стерильную каплю), то в результате капиллярной силы в пипетку могут попасть нежелательные частицы. После погружения в стерильную жидкость микропипетку подводят к выбранной клетке, и остаточная капиллярная сила засосет клетку в микропипетку. Затем конец микропипетки с нужной клеткой нужно перенести в следующую стерильную каплю, и клетку можно освободить путем выдувания.

Иногда стерильная капля, наряду с нужной клеткой водоросли, может содержать и другие частицы. Используя методику, описанную выше, можно перенести нужную клетку в следующую стерильную каплю. Эту процедуру можно повторять до тех пор, пока исследователь полностью не очистит клетку, которую затем можно поместить в емкость с питательной средой.

Диаметр конца пипетки должен быть по крайней мере в два раза больше диаметра клетки водоросли, но не больше, чем в несколько раз. Если диаметр пипетки будет меньше, это может повредить клетку при выделении, особенно если клетки голые или имеют жгутики. Если микропипетка имеет слишком большой наконечник, это может затруднить захват клетки и будет способствовать проникновению в пипетку нежелательных частиц. При выделении нитчатых водорослей, а также водорослей, образующих цепочки или одиночных длинных клеток (например, некоторых пеннатных диатомей), микропипетку следует направ-

лять к концу нити, цепочки или клетки. Микропипетку лучше держать под углом, чтобы клетки или нити можно было захватить без сильной деформации (Andersen, Kawachi, 2005).

Некоторые клетки обитают на дне чашки Петри. Попытки выделить эти клетки часто приводят к их повреждению и гибели. Быстрая обработка клеток может помочь в решении этой проблемы. Для этого клетки нужно достать сразу же после того, как будет отобран образец, чтобы водоросли не успели осесть на дно и там закрепиться. Затем клетку как можно скорее перенести в стерильную каплю. Эту процедуру нужно повторять до полной очистки клеток. При этом надо наблюдать за тем, чтобы водоросли не прикрепились к стенкам пипетки.

Хотя все методы выделения основаны на изоляции одиночных клеток – начиная с оригинального образца до выделения клеток в культуру – это не исключает использования и других подходов. Опытный исследователь может выделять несколько клеток и доводить их от природного образца до чистой культуры. Имея опыт, можно оценить жизнеспособность клеток. Для флагеллят прекращение плавания может быть признаком повреждения. Поврежденные клетки диатомей могут отражать свет иначе, чем нормальные клетки. Вытекание протоплазмы является очевидным признаком серьезных повреждений.

Другим подходом является выделение нескольких нужных клеток в питательную среду, которую нужно защитить от высыхания (например, с помощью парафильма). Затем эти клетки нужно оставить на период от нескольких минут до нескольких дней. Впоследствии жизнеспособные клетки могут быть отобраны, так как их можно будет отделить от поврежденных и мертвых клеток. Наконец, во многих случаях при использовании этой методики можно легко освободиться от клеток-загрязнителей. Этот метод уменьшает затраты времени на выделение нужных клеток, так как усилия исследователей направлены только на удаление загрязнителей. После удаления всех загрязнителей нужную клетку можно поместить в стерильную питательную среду.

Еще одна методика работы с микропипетками может быть использована для определения повреждения клеточных стенок некоторых диатомей, особенно крупных, и может быть полезна для получения клональных штаммов, которые могут быть двудомными. Кроме того, целенаправленные повреждения клеточных оболочек служат немаловажным фактором для нивелирования физического ограничения регенерации размеров. Например, ряд авторов (Rogerson et al., 1986) применяли этот метод для получения голых клеток *Coscinodiscus asterophalus*, используя повторную интродукцию клеток, помещенных в 1% раствор папаина (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6.3. Выделение клеток с использованием агара

5.6.3.1. Посев штрихом

Выделение водорослей на агаровых чашках также является одним из старейших и распространенных методов. Этот способ предпочтителен для выделения многих коккоидных и большинства почвенных водорослей. Популярность метода объясняется не только его легкостью, но и тем, что аксеничные культуры могут быть получены без использования других процедур. Для успеха этого метода водоросли должны расти на агаре. Некоторые флагоеллаты (например, *Heterosigma*, *Pelagomonas*, *Peridinium*) не растут на агаре, другие (например, *Chlamydomonas*, *Pavlova*, *Synura*, *Tetraselmis*) растут очень хорошо. Коккоидные клетки обычно очень хорошо растут на агаре, за некоторыми исключениями (например, *Aureococcus*, *Aureoumbra*). Большинство диатомовых водорослей и некоторые криптофиты тоже хорошо растут на агаре.

В большинстве случаев концентрация агара не является определяющим фактором, она может колебаться от 0,8% до 1,5-2%. Некоторые водоросли растут на «мокром» агаре (с концентрацией 0,3-0,6%), однако большинство водорослей все же хуже растут на влажных агаризованных поверхностях.

Агар также является хорошей средой для роста грибов и бактерий. Полевые образцы с существенным грибным загрязнением могут принести много неприятных сюрпризов, так как грибы растут очень быстро, образуя спорангии и споры, затрудняя выделение водорослей. Для удаления нитей можно использовать фильтры и органические вещества. Если рост грибов наблюдается в чашках Петри, то их лучше сразу выбросить, не открывая. Наоборот, бактерии часто образуют маленькие ограниченные колонии, и одновидовые культуры можно получить, если их аккуратно перенести с поверхности твердой среды. Исключение составляют бактерии из образцов бентоса, отобранные в тропиках, поскольку они часто содержат бактерии, которые «растворяют» участки на поверхности агара.

Выделение водорослей методом «штриха» аналогично методикам, используемым для изоляции бактерий. Микробиологической петлей берут небольшое количество образца, который потом распределяют по поверхности среды, используя одну из нескольких методик (рис. 16).

Сначала штрихи содержат большое число водорослей, однако по мере движения петли число клеток уменьшается до одиночных клеток. После посева водорослей чашки инкубируют до начала роста колоний. Время инкубации варьирует от нескольких дней для почвенных и пресноводных водорослей до нескольких месяцев для океанических видов. Затем колонии, образованные потомками отдельных клеток, выделяют в культуру. Колонии можно отделить с поверхности агара при помощи микропипетки или

нихромовой (платиновой) микробиологической петли. Микропипетку обычно используют в сухих условиях. Если пипетка «загружена» стерильной жидкостью, то небольшое количество жидкости может рассеяться по колонии. Когда конец микропипетки коснется колонии, некоторое число клеток попадает в пипетку. Затем микропипетку нужно быстро опустить в сосуд с питательной средой или в другую чашку Петри. Клетки следует осторожно выдуть из пипетки. Водоросли можно также посеять штрихом на другую агаровую чашку. Если клетки были выделены из отдельных клеток с соблюдением правил стерильности, постепенно можно получить чистую аксеническую культуру (Andersen, Kawachi, 2005).

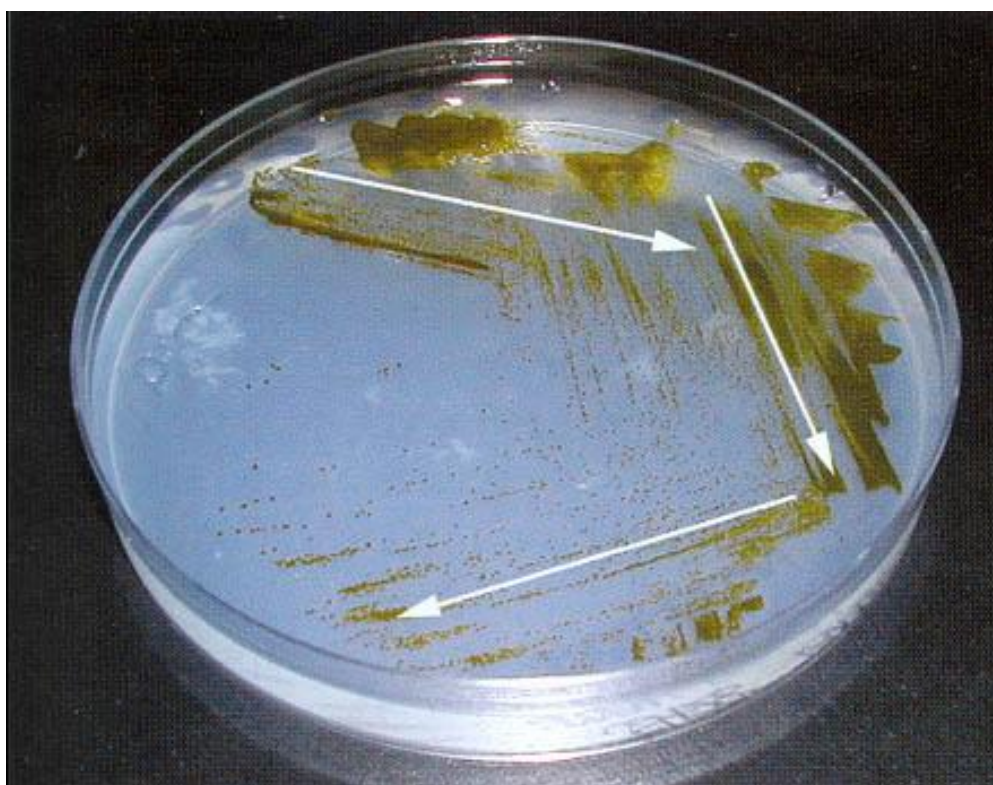


Рис. 16. Выделение водорослей методом «штриха» (Andersen, Kawachi, 2005). На фото можно увидеть, как на агаре по маршруту движения петли развиваются одиночные колонии водорослей

5.6.3.2. Культивирование водорослей внутри агара

Некоторые водоросли не растут на поверхности агара, но очень хорошо растут внутри него. Впервые эту методику использовал М.Бейеринк, однако он использовал вместо агара желатин. К.Скиннер (C.Skinner) применял интересную модификацию этого метода: он наливал агар в пробирки с водорослями, а потом, после инкубации, разбивал пробирки и доставал колонии водорослей (Andersen, Kawachi, 2005). Е.Прингшейм (Pringsheim, 1946) обобщил историю методики выращивания внутри агара.

Позднее эту методику стали использовать для выращивания океанских пикопланктонных видов (Brahamsha, 1996; Toledo, Palenik, 1997). Для получения погруженных в агар колоний клетки из полевого образца или обогащенной культуры смешивают с жидким агаром и потом разливаются в чашки Петри. Агар должен быть прохладным – чуть выше температуры застывания – для предотвращения чрезмерного нагревания водорослей. Для этих целей лучше использовать агар с низкой температурой застывания. После этого чашки нужно остудить. Затем колонии нужно инкубировать при нужной температуре и освещенности до появления колоний водорослей. Потом можно выделить нужные водоросли с помощью микропипетки и поместить в жидкую питательную среду. Хотя с помощью этой методики можно поддерживать культуру достаточно длительное время, все же в большинстве случаев способ выращивания клеток внутри агара используется для выделения культуры (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6.3.3. Методика автоматизированного распыления

Этот способ может использоваться для посева водорослей в чашки Петри. Методика может варьировать, однако суть метода состоит в распылении суспензии клеток водорослей с помощью специальных устройств (Pringsheim, 1946). Для достижения лучших результатов эту процедуру лучше проводить в стерильном боксе, чтобы бактерии и грибы не попали в чашку. После инкубирования клеток выросшие колонии водорослей переносят в жидкую питательную среду.

5.6.3.4. Выделение водорослей методом перемещения через агар

Агаровые чашки могут быть использованы для отделения нитчатых водорослей от эпифитов в качестве одного из этапов процесса выделения. Существует много различных вариаций этой методики. Обычно при использовании данного метода исследователи изготавливают из пипетки Пастера крючок, и с помощью этого крючка протаскивают нить через агар. Для более крупных нитей используется металлический крючок. Затем очищенная нить помещается в жидкую питательную среду или в чашку с агаром (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6.4. Метод разбавления

Метод разбавления используется уже в течение многих лет, он эффективен для организмов, которые содержатся в образце в большом количестве, но неэффективен для редко встречающихся организмов. Целью метода разбавления является помещение клеток в пробирку, колбу или «гнездо» пластиковой планшеты с последующим получением одноклеточных изолятов (Kufferath, 1928/29, Droop, 1954, Throndsen, 1978) (рис. 17).

Если знать приблизительную концентрацию клеток, то можно легко вычислить необходимое разведение, чтобы небольшой объем раствора (например, одна капля, 50 мкл, 1 мл) содержал одну клетку. Если приблизительная концентрация клеток неизвестна и не может быть быстро вычислена, то можно приготовить серию разбавленных растворов, уменьшая концентрацию от разведения к разведению в 10 раз. В большинстве случаев пятое или шестое разведение имеет необходимую концентрацию клеток (так, например, если в шестом разведении одна капля содержит одну клетку, то концентрация в первоначальном растворе была 10^6 клеток \times мл $^{-1}$).

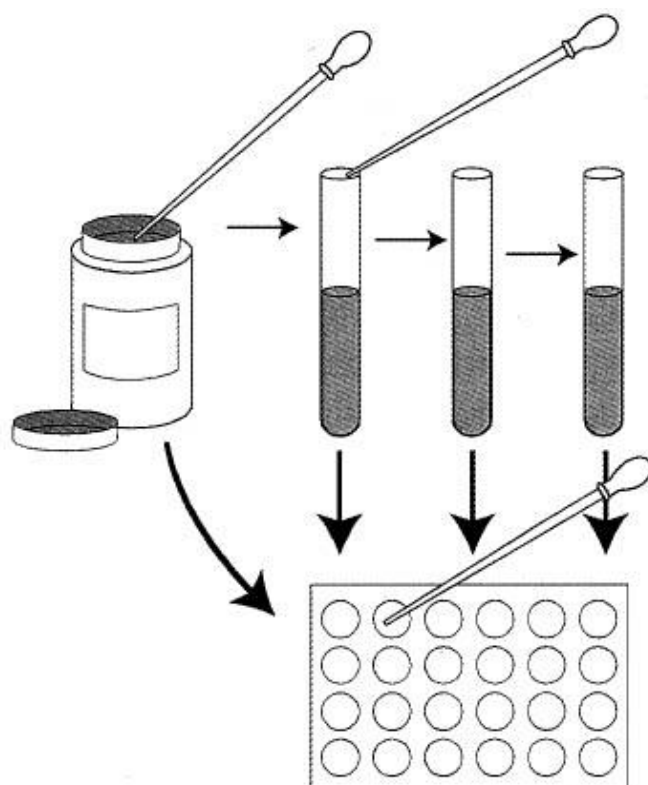


Рис. 17. Иллюстрация метода разбавления (Andersen, Kawachi, 2005). Аликвота берется из емкости с полевым образцом (слева) и помещается в пробирки, содержащие стерильную среду. После перемешивания, одна аликвота берется из пробирки и распределяется в планшете, содержащую стерильную среду, вторая аликвота добавляется в средние гнезда. После перемешивания процесс повторяется (распределение в гнезда и добавление в пробирки справа). Каждый цикл заключается в разбавлении природного образца и увеличивает возможность выделения отдельных клеток

Метод разбавления является наиболее распространенным методом, используемым при культивировании случайных видов из полевых образцов, особенно если целью исследователя является открытие новых видов. Применяются различные варианты этой методики. Во-первых, разведение

может проводиться в питательной среде, дистиллированной воде (для пресноводных организмов), морской воде (для морских организмов), отфильтрованной воде из полевого образца, или комбинации из этих растворов. Питательная среда может содержать все соли, необходимые для выделения широко распространенных организмов, или же быть очень разбавленной для редких видов. Во-вторых, усилия исследователей могут быть направлены на концентрации, при которых возможно выделение отдельных клеток (10, 50, 100 попыток). Обычно делают большое количество пробирок из последнего разведения, принимая во внимание, что в некоторых пробирках клетки могут погибнуть, другие могут содержать несколько видов, а в следующих водоросли вообще могут отсутствовать. В-третьих, в некоторые пробирки могут быть добавлены микроэлементы (например, аммоний, селен), если целью является выделение видов, которые нуждаются в этих добавках. Таким же образом можно инкубировать водоросли при разной температуре и освещенности. При помощи этой методики редко удастся получить аксеничные культуры, так как бактерии более многочисленны, чем водоросли (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6.5. Разделение водорослей центрифугированием и осаждением

Разделение водорослей на основе силы тяжести может быть эффективным для разделения организмов, различающихся по размерам. Для этого используют два метода: центрифугирование и осаждение. Сила тяжести, возможно, чаще используется для концентрации нужных организмов, чем для получения одновидовых культур. Целью этой процедуры является отделение более крупных и тяжелых клеток от более мелких клеток и бактерий. Легкая фильтрация в течение короткого времени может использоваться для очистки диатомовых водорослей и динофлагеллят от более мелких клеток. Эту процедуру можно повторять до полной очистки культуры. Для быстро плавающих динофлагеллят этот процесс нужно проводить очень быстро, так как водоросли могут уплыть обратно в жидкость. Кроме того, сильное центрифугирование может повредить клетки, особенно нежные организмы со стрекательными клетками. Сила и скорость центрифугирования зависит от вида водоросли и определяется эмпирически. Центрифугирование с использованием градиента плотности (например, силикатных солей) также может использоваться для разделения лабораторных культур (Reardon et al., 1979).

Метод осаждения применяется для разделения неподвижных крупных или тяжелых клеток. Образец слегка встряхивается и помещается в пробирку, колбу, цилиндр или другой сосуд для осаждения. Осаждение проводят до тех пор, пока большая часть нужных клеток не осядет на дно, в то время как более мелкие клетки будут оставаться в растворе. После

этого верхняя часть раствора сливается. Этот процесс можно повторять до получения нужного результата.

Как центрифугирование, так и осаждение эффективны для концентрации крупных клеток, однако с помощью этих методов трудно получить одновидовые культуры или выделить отдельные клетки. Для этих целей нужно комбинировать центрифугирование и осаждение с другими методами (фильтрацией, изоляцией клеток с помощью микропипеток и т.д.) (Andersen, Kawachi, 2005).

5.6.6. Выделение с использованием фитотаксиса

Фототаксис может быть использован для выделения флагеллят (Bold, 1942). Этот метод эффективен, если образец содержит один доминирующий вид флагеллят, обладающий фототаксисом. Если таких видов несколько, то процесс выделения отдельных видов затрудняется. Для этого метода необходима установка, включающая источник света. Самая простая установка представляет собой трубку со стерильной средой, на одном конце которой находится образец с водорослями, а на другом – источник света. После того как клетки продвинутся на достаточное расстояние в стерильную жидкость, они могут быть отделены с помощью микропипетки и помещены в стерильный сосуд. Для усовершенствования процесса выделения было предложено специальное устройство, состоящее из колбы со встроенным рукавом. Схема этого устройства изображена на рис.18.

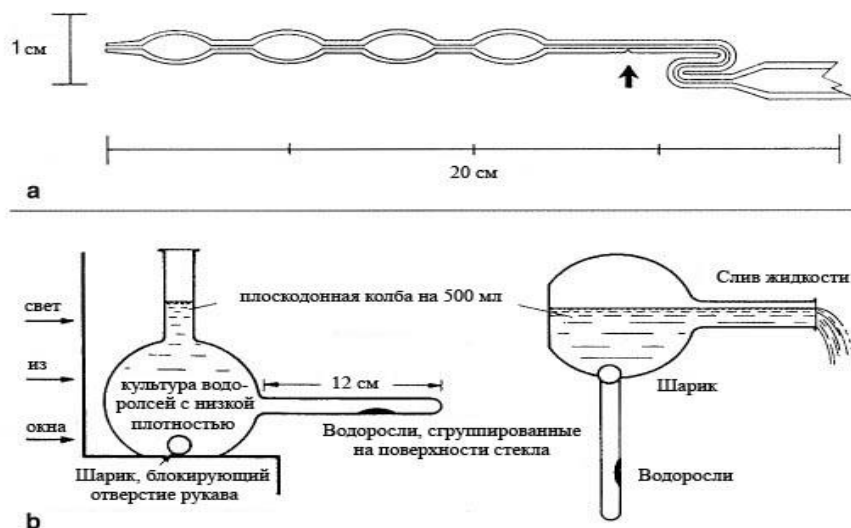


Рис. 18. Установка для выделения водорослей на основе фототаксиса (Andersen, Kawachi, 2005): а – флагелляты, обладающие способностью к фототаксису, засасываются через конец пипетки и затем перемещаются через отверстия в пипетке. Конец пипетки ломается в месте, указанном стрелкой и выбрасывается, а водоросли из пипетки переносят в стерильную пита-

тельную среду; b – флагелляты, не способные к фототаксису, концентрируются с помощью яркого света в узком рукаве колбы (слева) и остаются там после выливания в результате закрывания отверстия рукава стеклянным шариком

Образец и стерильные шарики помещаются в колбу, рядом с которой устанавливается источник света. После того, как подвижные клетки водорослей вследствие фототаксиса заплывают в рукав, колба наклоняется так, что шарики закрывают рукав, в то время как оставшаяся жидкость выливается.

Более сложный метод предполагает использование специально сконструированной микропипетки, отделяющей флагелляты от других организмов. Часть наконечника пипетки ломается и выбрасывается, а клетки, которые заплывают выше уровня пипетки, попадают затем в специальный сосуд. Некоторые неподвижные клетки водорослей (например, *Myxosarcina*) могут двигаться через агар к источнику света. После миграции отдельные клетки можно собрать и перенести в сосуд для дальнейшего культивирования (Andersen, Kawachi, 2005).

5.7. Специальные методы выделения водорослей

5.7.1. Выделение пикопланктона

Ультрапланктон ($\leq 5\mu\text{m}$) и пикопланктон ($\leq 2\mu\text{m}$) из-за своих мелких размеров представляют трудности при выделении. Самым простым методом изоляции мелких водорослей является выделение методом штриха на агаре. Крошечные пресноводные водоросли достаточно легко выделяются на агаре. Сложнее выделить океанские виды, однако для этих случаев имеются специальные модификации этого способа (Waterbury et al., 1986). Океанские виды можно также выделить методом разведения, однако таким образом не всегда удастся выделить одиночные клетки.

Для изоляции пикопланктона можно использовать и традиционную методику выделения с помощью микропипетки. Для очищения клеток от разнообразных частиц необходимо иметь чистую каплю воды. Это особенно важно для морских водорослей, так как в морской воде содержится большое число различных примесей (Jones, 1967). Разбавленная почвенная вытяжка, рекомендованная Е.Прингшеймом (Pringsheim, 1950), подходит для выделения не только крупных пресноводных организмов, но и для изоляции пикопланктона, если из нее предварительно будут удалены все частицы. Частицы могут также образовываться на поверхности стекла при автоклавировании. Стеклянная посуда иногда создает некоторые проблемы при выделении пикопланктона. Для предотвращения образования частиц в жидкости (например, морской воде, почвенной вытяжке или питательной

среде) существует два простых метода. Одним из методов может быть фильтрация с помощью фильтра с отверстиями диаметром 0,2 мкм. Другой метод заключается в том, что морской воде или питательной среде дают отстояться в течение 1-3 дней, после чего надосадочную жидкость аккуратно отбирают с помощью пластиковой пипетки.

При выделении пикопланктона следует соблюдать условия стерильности, и ни в коем случае не допускать попадания пыли в используемую посуду и материалы. Перед использованием посуды ее необходимо обработать кислотой, а затем несколько раз сполоснуть бидистиллированной или деионизированной водой. Посуду лучше стерилизовать в сухожаровом шкафу при температуре 250°C в течение 3 ч. При автоклавировании возможно образование микрочастиц на поверхности сосуда, которые затем переходят в раствор. Лучше всего использовать предварительно стерилизованную посуду, потому что ее поверхность не содержит частиц. Для этой цели очень хорошо подходят стерильные чашки Петри. Частицы могут образовываться также при стерилизации микропипетки в пламени. При выделении водорослей частицы копоти могут попасть в каплю с водорослями и затруднить их выделение. Таким образом, усилия исследователей должны быть направлены на предотвращение попадания любых микрочастиц в раствор с водорослями, потому что эти микрочастицы очень трудно отличить от пикопланктона.

При выделении пикопланктона освещение является критическим моментом. При работе с бинокулярной лупой освещение по методу темного поля предпочтительнее проходящего света. При темнопольной иллюминации крошечные клетки отражают свет таким образом, что их можно увидеть при увеличении $\times 2$ (рекомендуется использовать большее увеличение). В жидкости клетки водоросли могут переворачиваться, и даже маленькая вспышка света, исходящая от хлоропласта при вращении клетки позволяет отличить клетку водорослей от бактерий или других клеток. С помощью микропипетки можно захватить клетки и поместить в стерильную каплю. Очень важным моментом является использование маленькой капли, так как очень маленькую клетку трудно найти в большой капле. Необходимо работать очень быстро, так как маленькая капля может быстро испариться. С помощью инвертированного микроскопа можно легче выделить клетку.

Крошечные клетки часто бывают более чувствительными к компонентам питательной среды, и после успешного выделения клетка водорослей может погибнуть в питательной среде. Для океанских видов их лучше всего поместить в каплю морской воды на несколько дней. После появления признаков нормального роста водоросли можно перенести в питательную среду (Andersen, Kawachi, 2005).

5.7.2. Выделение водорослей, прикрепленных к субстрату

Некоторые организмы сильно прикрепляются к поверхности, и во избежание повреждения клеток при их изоляции, необходимо работать очень осторожно. При выделении таких необычных водорослей следует использовать и неординарные методы изоляции. Например, обработка ультразвуком или более сильное перемешивание в данном случае не подходят, так как клетки могут затеряться, что сделает невозможным их дальнейшее выделение. Наиболее простым способом выделения таких водорослей является смыв струей воды из микропипетки. После смыва клетки следует быстро захватить, сполоснуть и поместить в среду для культивирования.

Некоторые прикрепленные водоросли (например, динофлагелляты) прикрепляются так сильно, что их невозможно отделить от субстрата с помощью струи воды. Существует другой метод выделения таких водорослей в культуру. Он основан на том, что некоторые водоросли, такие как *Amphidinium restudo* Herdman и *Spiniferodinium*, образуют подвижные клетки, но, к сожалению, период образования новых подвижных клеток сравнительно короток. При использовании данной методики обогащенные культуры изучаются несколько раз в течение одного дня, чтобы заметить начало образования новых, еще не прикрепившихся к субстрату клеток. Некоторые бентосные динофлагелляты образуют подвижные клетки через несколько часов после начала светлого периода суток. В этот период у исследователя появляется шанс для выделения таких клеток с помощью микропипетки.

Если перечисленные выше методы не дают нужного результата, могут быть предприняты более решительные попытки к их выделению. Рассмотрим пример отделения водорослей, прикрепленных к пластиковому субстрату (например, чашки Петри или пластиковые тарелки). В этом случае нежелательный материал может быть удален вокруг нужной клетки с помощью тонкой кисточки для рисования (для удаления более крупных частиц) или микропипетки (для удаления более мелких частиц). Далее, используя бритву или скальпель, осторожно вырезают часть сосуда вокруг клетки и переносят кусочек пластика вместе с содержащимися клетками в новый сосуд для культивирования (Andersen, Kawachi, 2005).

5.7.3. Выделение аэрофильных водорослей

Аэрофильные эпифитные водоросли растут на субстратах, находящихся в воздушной среде (например, коре деревьев, листьях, камнях и почве, зданиях и т.д.). Разнообразие водорослей, обитающих на этих субстратах, удивляет. Например, Дж.Фоерстер (Foerster, 1971) обнаружил 77 родов в лесах Пуэрто-Рико, другие альгологи (Schlichting, Milliger, 1969) выделили 91 вид микроорганизмов (в основном водорослей), обитающих

на гигантском водяном жуке *Lethocerus*. Наиболее изученной группой водорослей являются почвенные водоросли (Ettl, Gärtner, 1995), хотя водоросли, обитающие на других субстратах, тоже довольно хорошо исследованы (Brook, 1968; Schlichting, 1969, 1975). Образцы отбирают путем соскабливания, разделения на кусочки и т.д. Способы выделения таких водорослей также разнообразны, но чаще всего используется метод обогащенных культур и метод непосредственного выделения. Существует интересная методика выделения аэрофильных водорослей (Schlichting, Milliger, 1969), основанная на погружении водяного жука прямо в питательную среду. При непосредственном выделении клетки могут быть помещены на поверхность агара, а колонии, образовавшиеся позже из этих одиночных клеток, могут быть помещены в среду для культивирования.

Водоросли, обитающие на поверхности водоемов («seafoam»), занимают положение между субаэриальными и аэриальными водорослями. Их можно отбирать с помощью ножа или ложки, затем поместить в стерильный пластиковый пакет, а затем в лабораторных условиях культивировать с использованием классических методов. Такие накопительные культуры являются источником многочисленных водорослей, преимущественно пресноводных.

Аэриальные водоросли изучены меньше, чем субаэриальные (Schlichting, 1969; Smith, 1973). Так, например, П.Смит (Smith, 1973) выделил 44 вида водорослей в Ралегхе (Северная Каролина). Методы отбора образцов аэриальных водорослей без загрязнения подробно описаны в статье Х.Шлихтинга с соавторами (Schlichting et al., 1971).

5.7.4. Выделение эпифитов после обработки ультразвуком

Эпифитные водоросли, обитающие на более крупных водорослях или других организмах, достаточно трудно выделить с помощью микропипетки. Если попытаться соскоблить эпифиты, то можно повредить их клетки. В этом случае наиболее оптимальным вариантом является обработка ультразвуком. Этот способ позволяет нужным клеткам водорослей перейти в раствор, из которого их можно легко выделить (Brown, Bischoff, 1962; Hoshaw, Rosowski, 1973).

5.7.5. Выделение водорослей, живущих в песке

Песок является обычным субстратом для сообществ эпипелона (Round, 1981). В песке обитают два вида водорослей: флагелляты, которые свободно плавают среди песчинок и водоросли, которые растут, прикрепляясь к песчинкам. Первые намного легче выделить, чем последние, так как песчинки помимо водорослей могут содержать и другие прикрепленные организмы.

Рассмотрим метод выделения водорослей, свободно плавающих среди песчинок. Во время сбора образцов верхний слой песка собирается с помощью стеклянной пробирки, бутылки с широким горлышком или маленьким совком. Ф.Раунд (Round, 1981) предложил помещать песок и воду в чашки Петри, а затем собирать клетки водорослей, поднявшиеся наверх, с помощью микропипетки, или позволять им расти на плавающих покровных стеклах. Стекла потом извлекаются с помощью пинцета и потом исследуются с помощью микроскопа. В случае обогащенных культур покровные стекла помещаются в чашки Петри со стерильной средой, покрываются парафином и инкубируются.

Существует другой метод выделения. Небольшое количество песка помещают в прозрачную пластиковую чашку с крышкой, куда добавляют необходимое количество питательной среды. Потом чашку наклоняют таким образом, чтобы песчинки оказались на одной стороне. Когда песок осядет, чашку снова переворачивают в нормальное положение. На другой стороне чашки устанавливают преграду для песка (например, палочки для еды) таким образом, чтобы образовалась своеобразная камера для культивирования. Затем с помощью бинокулярной лупы изучают клетки и выделяют нужные для дальнейшего культивирования.

М.Хоппенрат (Hoppenrath, 2000) отделял прикрепленные к песку динофлагелляты, помещая замерзшую морскую воду на фильтр (с диаметром пор 0,45 мкм). По мере таяния жидкость проходит через песок и вымывает водоросли. Этот метод представляет собой модификацию, предложенную Г.Ухлингом (Uhling, 1964).

Выделение водорослей из грязи является более трудной задачей, потому что грязь не оседает на дно. Для выделения водорослей можно использовать метод прикрепления к покровным стеклам и метод разведения. Выделение с помощью микропипетки возможно только при сильном разбавлении грязи.

5.7.6. Выделение цист из осадков

Осадочные образцы содержат большое количество разрушенных органических остатков, что препятствует выделению водорослей. Для выделения флагеллят осадки могут обогащаться питательными веществами и инкубироваться на свету для прорастания цист. После прорастания цист водоросли могут быть выделены с помощью методов, описанных выше. В свою очередь цисты могут быть отделены от осадков с помощью нескольких методов (Wall et al., 1967; Matsyoka, Fukuyo, 2000). В этом случае концентрированные цисты могут быть собраны, промыты, а затем отдельные цисты могут быть помещены в контейнер для дальнейшей изоляции.

В некоторых случаях при прорастании цист происходит изменение ploидности (например, диплоидные цисты делятся митотически, произво-

для гаплоидные клетки). Если важно выделить каждую гаплоидную клетку (например, при изучении полового размножения), применение в дальнейшем метода обогащенных культур невозможно. В этом случае необходимо изолировать каждую цисту путем пересадки в отдельный сосуд для культивирования (например, в пластиковую планшету) для того, чтобы можно было отслеживать процесс прорастания. Наблюдение ведут через каждые 1-2 часа. После прорастания цист четыре гаплоидные клетки должны быть выделены индивидуально и перенесены в культуру. Штамм водоросли, полученный из этих одноклеточных изолятов, должен содержать как женские, так и мужские клеточные линии (Andersen, Kawachi, 2005).

5.7.7. Выделение водорослей, обитающих в проточных водоемах

Некоторые виды, особенно растущие в проточной воде, для нормального роста требуют движения воды (то есть они погибают при выращивании в обычных сосудах). Для культивирования таких водорослей необходимо использовать специальные вращающиеся сосуды (например, производства Bellco., Inc.) в комплекте с необходимым оборудованием для создания движения. Таким же образом можно поместить сосуд для культивирования в специальное устройство для создания движения воды.

Таким образом, выделение водорослей представляет некоторые сложности для начинающих исследователей, однако при наличии достаточной практики можно быстро получить необходимые навыки. Во многих случаях изобретательность может облегчить этот процесс как в хорошо оборудованной лаборатории, так и полевых условиях. Наличие необходимого оборудования позволяет сделать процесс выделения водорослей более легким и успешным. При выделении таких водорослей оборудование может потребоваться в любой момент, поэтому все необходимые материалы нужно хранить в стерильном состоянии (Andersen, Kawachi, 2005).

5.7.8. Удаление диатомовых водорослей с помощью диоксида германия

Диатомовые водоросли могут создавать проблемы для ученых, пытающихся их выделить. Диатомеи растут очень быстро, и их бурный рост тормозит развитие других водорослей. В большинстве случаев добавление диоксида германия в образец, накопительную культуру или выделенную культуру, загрязненную диатомовыми водорослями, ведет к гибели большинства или всех диатомовых водорослей (Lewin, 1966). Германий замещает кремний в биохимических реакциях, что приводит к их гибели. Для большинства других водорослей (за исключением красных водорослей) высокие концентрации германия не являются токсичными (McLachlan et al., 1971). Эффект диоксида германия достигается при его концентрации от

1 до 10мг/л. Токсичность диоксида германия во многом определяется и временем внесения. При получении накопительных культур диоксид германия лучше всего добавить сразу же. Если добавить диоксид германия уже после развития диатомовых водорослей, для удаления диатомей понадобится значительно больше времени.

5.7.9. Удаление синезеленых водорослей с помощью антибиотиков

Синезеленые водоросли могут также мешать развитию других групп водорослей. К счастью, синезеленые водоросли можно эффективно удалить с помощью антибиотиков, так как они являются прокариотами. Однако одни антибиотики более эффективны, другие менее. Но в большинстве случаев методом проб и ошибок можно найти нужную комбинацию антибиотиков, а также рассчитать необходимые концентрации.

Контрольные вопросы

1. Кто впервые описал методы выделения водорослей?
2. Какие факторы влияют на выделение водорослей?
3. Какова методика отбора образцов в природных условиях?
4. Перечислите материалы и оборудование, необходимые для выделения водорослей.
5. Какова методика получения накопительных культур?
6. Укажите основные способы выделения водорослей в культуру.
7. Опишите методику выделения водорослей с помощью микропипетки.
8. Перечислите специальные методы выделения водорослей, используемые в практике альгологических исследований.

ГЛАВА 6. МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ АЛЬГОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Целью методов очистки является получение жизнеспособной культуры одного вида, свободной от других видов («загрязнителей» – эукариот, прокариот и вирусов). Идея чистых культур берет свое начало со времен Коха и Пастера относительно бактерий. Для водорослей термин «одновидовой» стал означать культуру водорослей одного вида, и если культура не имела загрязнителей, она стала называться «чистой» или «аксеничной». Термин «гнотобиотик» обычно используется для индивидуумов больших по размеру видов, свободных от микроорганизмов или паразитов. В связи с тем, что некоторые водоросли частично или полностью гетеротрофны, имеется необходимость поддерживать жизнеспособность живых или погибших культур бактерий, других водорослей, или протист. Такие культуры иногда называются *биксеничными*. Для других культур трудно дать однозначное определение (например, для культуры *Pinnularia* с эндосимбиотическими бактериями) (Guillard, 2005).

6.1. Основные условия очистки культур

Методы получения аксеничных культур включают все приемы получения чистых культур. В последнее время все шире используется новейшее оборудование, в связи с чем старые методы совершенствуются и сочетаются с новыми и эффективными способами очистки.

Общая схема методов изоляции и очистки представлены на рисунках 19 и 20. В методах очистки могут быть использованы все, некоторые, или только несколько операций. Однако обычно одновидовые культуры можно очистить, как это рекомендовал делать Е.Прингшейм (Pringsheim, 1946).

Некоторые способы могут использоваться в особых случаях очистки, которые не показаны на рисунке 19. Они включают использование детергентов для разделения клеток и частиц, обработку ультразвуком, перемешивание, фрагментацию нитей, колоний и талломов некоторых водорослей. Эти способы очистки показаны на рисунке 20.

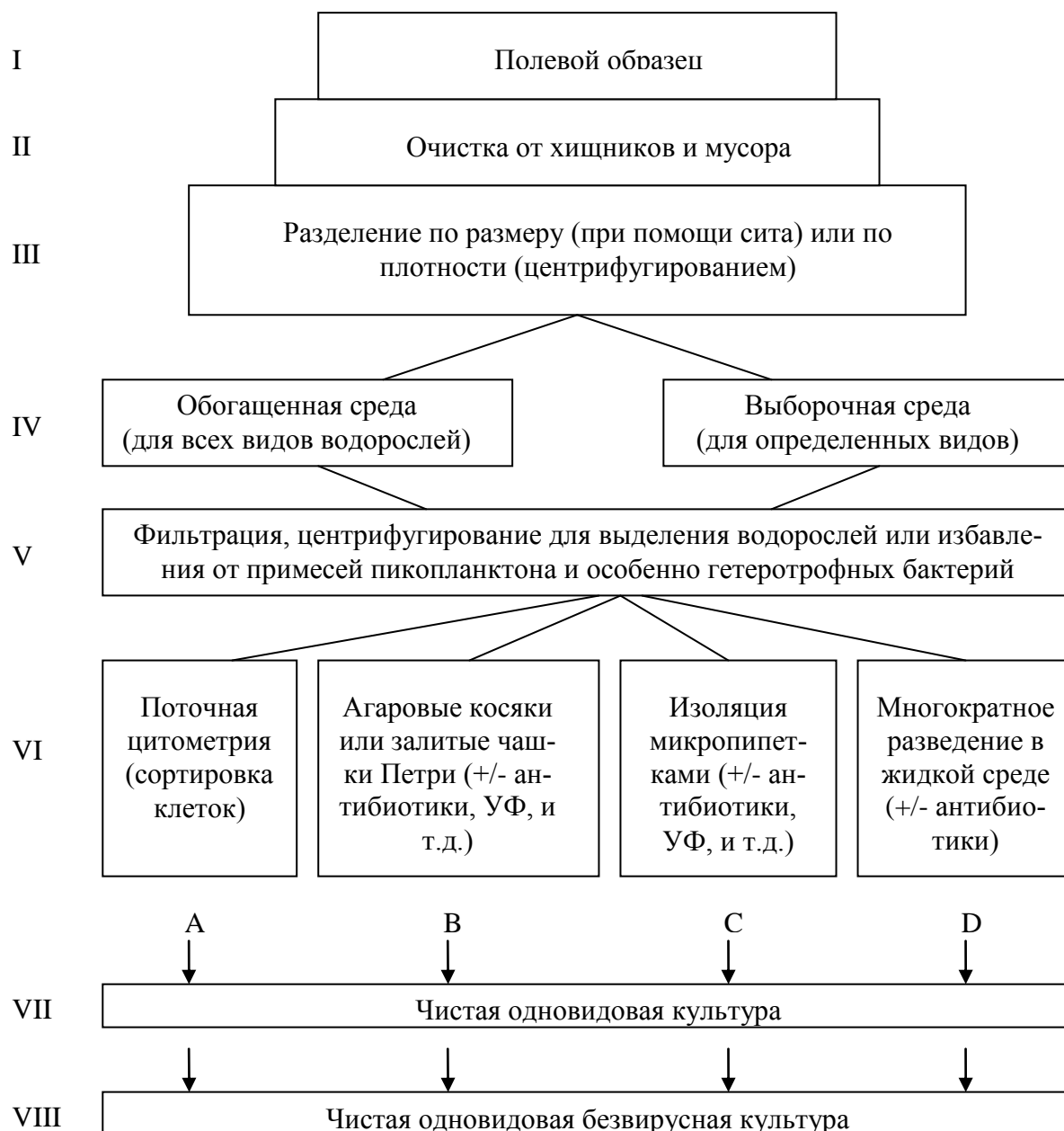


Рис. 19. Последовательность очистки и изоляции одноклеточных водорослей (Guillard, Morton, 2003)

| | | |
|-----|---|--|
| I | Полевой образец | Налеты водорослей, корки из водорослей, кора, камни, древесина, колонии водорослей, эпифиты |
| II | Основная очистка | Выделение водорослей с помощью щипцов, игл, бритвы, захват колоний. |
| III | Разрушение для лучшей очистки | Встряхивание, размешивание, обработка ультразвуком, детергентами (часто в комбинации с шагом IV) |
| IV | Концентрирование водопослей | В соответствии с клеточной массой и плотностью: осаждение, центрифугирование, послойное центрифугирование, центрифугирование по градиенту плотности. В соответствии с размерами: выборочное по размеру фильтрование (для крупных водорослей), мембранное фильтрование (для мелких). |
| V | Отделение единичных нитей или клеток (шаг VI на рис.19) | |

Рис.20. Последовательность очистки и изоляции колониальных водорослей (Guillard, Morton, 2003)

В практике методов получения альгологически чистых культур водорослей существует два противоположных способа очистки. Один способ (открытый способ) подразумевает физическое разделение нужных организмов от нежелательных загрязнителей в несколько этапов. Другой способ направлен на уничтожение контаминантов (закрытый способ). Если существует несколько загрязнителей, может понадобиться несколько этапов очистки с использованием различных методов для успешного уничтожения нежелательных объектов. Это также необходимо, если контаминант имеет несколько стадий жизненного цикла в культуре. Выделение организма в одновидовую или аксеничную культуру должно рассматриваться сугубо индивидуально применительно к данному моменту. Например, собираясь на охоту, рыбалку или пикник, надо выбирать подходящее данному случаю необходимое оборудование и снаряжение. Так и в эксперименте, не существует единой универсальной методики для всех ситуаций, поэтому в каждом случае нужно искать особые подходы к очистке.

6.2. Оборудование для культивирования и питательные среды

Главным необходимым требованием при культивировании является сохранение жизнеспособности нужного организма. Для клеток водорослей наиболее уязвимым моментом является влияние химического или физического окружения, когда они помещаются в пробирку или чашку Петри. В некоторых случаях это окружение бывает губительным. Чувствительность может быть обусловлена как следствием отсутствия защиты у клеток к химическим процессам, происходящим в среде (например, хелированием клеточных экссудатов), так и растворением в среде токсичных материалов. Эти эффекты обсуждаются во многих работах (Davies, 1983; Stokes, 1983; Price et al., 1988/89).

Чувствительность водорослей к среде обитания заслуживает внимания в связи с биологическими пробами на токсичность материалов, поэтому для изоляции и очистки и, следовательно, для поддержания жизнеспособности культуры необходима избыточно высокая концентрация веществ, в противном случае эта среда будет не пригодна для каждой отдельной клетки. В соответствии с рекомендациями Л.Брандта с коллегами (Brand et al., 1981), необходимы многочисленные опытные процедуры, направленные на устранение лаг-фазы при пересеве культуры, что необходимо для определения оценок акклимационного роста. Методы культивирования, сбора и хранения образцов морской воды усовершенствованы в соответствии с методикой очистки и экстраочистки, которая сейчас принята в качестве стандарта (Guillard, 2005). Исходя из этой методики, необходимо соблюдать осторожность при приготовлении питательных сред для выделения водорослей. Так как пресная вода содержит очень небольшое количество ионов, выщелачивание элементов и химическая трансформация не представляет особой проблемы, однако остается проблема загрязнения металлами во время автоклавирования (Guillard, 2005).

В то время как температура является фактором, легко контролируемым во время манипуляций по очистке, свет не относится к числу таких регулируемых факторов. Этот вопрос рассматривался Л.Брандом для морских фитопланктонных видов, однако эти положения можно отнести и к пресноводным видам. Существуют обзоры об эффекте качества и количества света на культуры динофлагеллят (Guillard, 2005).

6.3. Методы и техники очистки

6.3.1. Очистка с использованием разницы в размере и фильтрация

Эти методы могут использоваться для очистки на нескольких уровнях, но наиболее часто они применяются для очистки одновидовых культур от нежелательных прокариот и дрожжей. Многократная очистка с использованием мембранных фильтров является одним из наиболее эффективных методов в ходе очистки, так как большинство водорослей значительно крупнее гетеротрофных бактерий. Когда нужный вид крупнее пор фильтра, на нем концентрируются клетки водоросли. После процедуры фильтрации фильтр необходимо промыть стерильной водой или средой. Для некоторых процессов необходимо только несколько клеток. Если требуется большее количество клеток водоросли, можно использовать фильтр с более крупными отверстиями или повторить процедуру фильтрации несколько раз.

Водоросли мелких или средних размеров могут быть очищены от дрожжей или других грибов путем многократной фильтрации. Гифы грибов могут быть отфильтрованы, однако их споры могут пройти через отверстия фильтра вместе с водорослями. В этом случае можно добавить в фильтрат небольшое количество экстракта мальтозы или другой органической субстанции, к которой водоросли толерантны. Споры водорослей прорастают в течение 1 или 2 дней и образуют нити, которые могут быть удалены до образования новых спор. Для предотвращения прорастания преждевременно созревших спор процедуру необходимо повторить. Многоступенчатая фильтрация может также использоваться для наименьших по размерам фотосинтезирующих видов. Так, например, Дж.Ватербери с коллегами (Waterbury et al., 1986) смогли получить штамм *Synechococcus*, свободный от других видов и гетеротрофных бактерий с использованием фильтра с порами размером 1 и 10 мкм и произвести окончательную очистку путем фильтрации.

Не доказано, что существует какое-либо простое определение взаимосвязи между номинальным размером пор фильтра и размером организмов при разделении. Этот вопрос исследовали в связи с оценкой продуктивности пикопланктона с использованием фильтрации пресноводных и морских популяций. Образцы фильтровались последовательно через поры фильтра «Nucleopore» размером 3,0; 2,0; 1,0 и 0,2 мкм в диаметре. Эукариотические и прокариотические пикопланктонные популяции были исследованы с использованием флуоресцентной микроскопии на фильтрах (гетеротрофные бактерии не исследовались). Основным выводом из этих ис-

следований было то, что фильтр с порами 1,0µм не был универсальным для очистки (Guillard, 2005).

Хотя эти эксперименты не дали положительного результата для оценки продуктивности, они были очень полезны для выделения и очистки водорослей.

6.3.2. Дифференциальное центрифугирование

При очистке свободно живущих планктонных эукариот центрифугирование играет такую же роль, как и дифференциальная фильтрация. Центрифугирование продолжают до тех пор, пока более тяжелый организм не осядет на дно пробирки. После этого надосадочную жидкость удаляют. Эту процедуру можно повторять до тех пор, пока не получится нужный результат. В градиенте центрифугирования по плотности различные клетки уравниваются в градиенте в соответствии с их плотностью. Т.Зитц и Р.Шмидт (Sitz, Schmidt, 1973) отделили *Synechococcus lividus* Copeland от гетеротрофной бактерии в градиенте Фиколи, затем продолжили очистку на агаре. Центрифугирование особенно эффективно при сочетании ультразвука с другими методами очистки клеток или колоний водорослей друг от друга, бактерий или детрита.

6.3.3. Использование ультразвука и перемешивание

Образцы из больших компактных колоний, водорослевых корок, влажных почв или грязи должны быть разделены вручную с помощью ножниц или пинцета. Следующие процедуры могут включать в себя измельчение водорослей между стерильными стеклами, очистки с помощью шприца или использование гомогенизирования (Rippka et al., 1981). Целью этих процедур является получение мелких и пригодных для манипуляций частиц. Эти же процедуры могут применяться к водорослям, соскобленным с деревьев или других мягких субстратов, включая макрофиты. Однако образцы со скал, раковин, кораллов или других пористых материалов требуют использования механической гомогенизации после просеивания или механического разделения. Иногда необходимо приготовить обогащенные жидкие или агаровые культуры для получения разделяемых частиц водорослей.

Два вида аэрофильной водоросли *Trentopohlia* были очищены до аксеничной культуры путем перемещения коротких нитей через агар при помощи микроманипулятора Шермана (Lim et al., 1992). Водоросли соскабливали с поверхности скал (*T.aurea* (L.) Martius) и деревянных стен

(*T.odorata* (Wiggers) Wittrock), встряхивали в дистиллированной воде для разделения нитей на короткие фрагменты, которые помещали на поверхность агара в чашках Петри. Отдельные нити по 3-5 клеток поднимали специальным крючком и протаскивали через агар для удаления загрязнителей. В случае с *T.aurea*, которая имела более длинные клетки и более жесткие нити, не все загрязнители были удалены при протаскивании через агар. Для дальнейшей очистки применяли промывание 5% молочной кислотой в течение 30 минут и дальнейшее ополаскивание. Примерно половина нитей выжила, из некоторых были получены аксеничные культуры. Микроманипулятор, описанный Д. Трондсеном (Throndsen, 1973), использовался в качестве микропипетки, микрокрючок – для захватывания отдельных водорослевых частиц. Эти приспособления позволили изолировать культуру из отдельной капли.

Для материала с разделяемыми частицами водорослей лучшим способом очистки является обработка ультразвуком с последующим центрифугированием. Эта методика использовалась для очистки бактерий (Solp, Starr, 1981), микроводорослей, цианобактерий, включая *Microsystis* (Watanable et al, 1985). М.Ватанабе с коллегами (Watanable et al, 1985) разделяли загрязненную культуру *Microsystis* в течении 30с при частоте 20кГц, в результате чего большинство колоний разделялось на отдельные клетки. Культуральный материал центрифугировали и растворяли в дистиллированной воде 4 раза, после чего отдельные клетки изолировали с помощью микропипеток. М.Ширай с соавторами (Shirai, 1989) помещали материал на агаризованную среду с использованием таких же методов разделения и центрифугирования. Для очистки эукариотических водорослей также использовали ультразвук более низкой частоты (90кГц) в течение 5-20мин после повторного центрифугирования (Brown, Bischoff, 1962).

Ультразвук использовался для получения чистых культур миксобактерий (Sutherland, 1976). Для этого вегетативные клетки миксобактерий и других загрязнителей уничтожали соответствующей обработкой ультразвуком. Микроцисты миксобактерий были более устойчивы к ультразвуку и давали впоследствии чистые культуры. Эта методика может применяться для эукариотических водорослей и цианобактерий, которые имеют споры или другие устойчивые стадии развития. Данные об эффекте времени обработки ультразвуком представляют особый интерес.

Как ультразвук, так и центрифугирование уменьшает активную защиту поверхности клеток, что способствует росту прикрепляющихся к клетке организмов. При использовании ультразвука может происходить разрушение клеточных структур, центрифугирование также может вызывать разрушение клеток (Nelson, Brand, 1979).

6.3.4. Очистка путем разведения

Очистка путем многократного разведения культуры – один из наименее трудоемких методов очистки. Он наиболее эффективен, когда сочетается с повторной асептической фильтрацией или центрифугированием. Перед серией разведений в культуру необходимо добавить антибиотики или другие химикаты. По нашим сведениям, никому не удавалось получить чистую культуру путем последовательного разведения культуры после использования антибиотиков. В результате этой процедуры были бы удалены фотосинтезирующие прокариоты, так как они рассматривались бы как загрязнители.

В природных образцах нефотосинтезирующие бактерии по численности превосходят все другие организмы. Таким образом, многократное разведение не пригодно для очистки полевых образцов. Однако некоторые исследователи (Waterbury et al., 1986) добились успеха в очистке культуры *Synechococcus* из образца морской воды (с концентрацией клеток 10^5 /мл). Они концентрировали раствор и очищали его от гетеротрофов путем дифференциальной фильтрации (фильтры 1 и 10 μ m «Nucleopore»). Во всех пробирках с разведением $1:10^4$ водорослей наблюдался их рост (в некоторых пробирках - вместе с другими водорослями). В большинстве пробирок с разведением 10^5 была культура *Synechococcus* (Waterbury et al., 1986). Для значительного разведения иногда требуется до 120 пробирок. Таким образом, непосредственная очистка без обогащенных культур возможна, если концентрация загрязнителей уменьшается в том же порядке, что и значение концентрации культуры, и используется большое количество разведений (Guillard, 2005).

6.3.5. Агаровые чашки

Очистка с помощью чашек с агаром – один из первых и часто используемых методов, однако он эффективен только для водорослей, которые могут расти как на поверхности агара, так и внутри. Для таких водорослей это еще и метод выбора для изоляции одновидовых культур. Наиболее подробно метод агаровых пластинок рассмотрен в справочнике «Водоросли» (1989). В агар часто добавляют антибиотики или другие селективные агенты. Некоторые нитчатые водоросли могут расти или скользить далеко от загрязнителей по поверхности агара, как это могут делать некоторые диатомовые или споры цианобактерий. Некоторые виды обладают фототактическим движением, которое можно обнаружить при помещении чашки с культурой непосредственно под источник света.

Приготовление питательных сред иногда является критическим моментом. Со времен Е.Прингшейма известно, что лучше всего автоклавируют агар отдельно, однако эта процедура легче выполнима для пресноводных видов (Allen, 1973). Низкотемпературная и ультранизкотемпературная агароза (застывающая при $t=17^{\circ}\text{C}$) может использоваться для чувствительных к температуре видов и предотвращения снижения активности антибиотиков, которые не переносят высокотемпературного шока. Агароза, застывающая при низкой температуре, важна для очистки пресноводной цианобактерии *Microcystis*. Этот процесс может сочетаться с воздействием ультразвука и центрифугированием (Watanable et al., 1985). Данный способ также важен для очистки пресноводной водоросли *Synechococcus* с использованием техники «бедной» культуры (Watanable et al., 1998).

Агароза также используется для более высокой степени чистоты культуры по сравнению с агаром, который загрязнен многими контаминантами (Guillard, 2005).

6.3.6. Очистка с помощью микропипеток

Этот способ в основном схож с теми процедурами, которые используются для получения одновидовых культур с более высокими требованиями к стерильности. Организмы должны изолироваться непосредственно в чистую культуру с помощью микропипетки. Однако более распространенным способом является получение чистой культуры из обогащенной, одновидовой или аксеничной, а не очистка загрязненной культуры. Техники и оборудование, применяемые для этого процесса, были детально описаны для каждого исследуемого объекта (Водоросли, 1989; Guillard, Morton, 2003). М. Друп (Droop, 1969) отмечал, что манипуляции по очистке требуют терпения и навыка, но, как и езда на велосипеде, после приобретения опыта не представляют особой трудности, так и этот способ можно легко освоить.

Процедура использования микропипетки заключается в следующем. Если жизнеспособная культура растет быстро, то плотность этой культуры может быть уменьшена наполовину (она сможет хорошо расти после пересева). В связи с этим, обогащенные культуры должны сортироваться по размерам с использованием фильтра «Nucleopore» и других фильтров для достижения высокой концентрации. Потом очищенную культуру необходимо промыть над фильтром стерильной средой (не содержащей загрязнителей размером с бактерии). На фильтре должны задерживаться клетки водорослей, но бактерии должны проходить через отверстия фильтра. Клетки водорослей не должны высыхать на поверхности фильтра. Необходимо дважды промыть клетки водорослей, переместив их с помощью пипетки на поверхность нового сте-

рильного фильтра. После окончания промывки следует перенести клетки водорослей в стерильную пробирку или колбу. Эти процессы не займут много времени, если все оборудование подготовлено заранее. Для многих видов водорослей, особенно флагеллят, рекомендуется поместить промытую культуру обратно в привычные условия культивирования на короткое время – примерно на 1 час. Если необходимо использовать антибиотики, то в колбу с антибиотиком или другим химикатом вносят промытую культуру в качестве инокулята. В тех случаях, когда антибиотик не используется, изоляция с помощью микропипетки может начинаться немедленно. Выбранная клетка обычно помещается в ванночку для промывания, по крайней мере, один раз перед помещением ее в пробирку для культивирования (даже если она была взята из раствора с антибиотиком). При каждом промывании во время пересева необходимо использовать новую пробирку, чтобы бактерии не попали вместе с клетками водорослей. Лучше поместить клетки водорослей в среду (воду) стерильной микропипеткой. Рекомендуется использовать бинокулярный микроскоп, так как размеры капли намного больше клеток водорослей. В случае очень мелких клеток нужно работать при большем увеличении микроскопа (Guillard, 2005).

6.3.7. Использование антибиотиков

Хотя с помощью антибиотиков теоретически можно уничтожить все бактерии в смешанных культурах с сохранением водорослей, на практике это практически невозможно. Эти методики уменьшают количество бактерий до ничтожно малых количеств. Однако даже при пересеве одной клетки водорослей бактерии могут попасть в свежую среду. В основном выбор антибиотика определяется видом антибиотика, его концентрацией и временем использования. Если при использовании одного антибиотика не удалось уничтожить все бактерии, то желаемого результата можно достичь при использовании другого антибиотика.

Не существует однозначных рекомендаций по использованию антибиотиков, однако можно выделить несколько важных моментов:

- при применении антибиотиков, замедляющих синтез клеточных стенок, для стимуляции деления клеток необходимо добавлять некоторое количество органических веществ, так как эти антибиотики убивают бактерии только во время активного роста клеток;
- не рекомендуется одновременное использование ингибиторов деления клеточной стенки (например, пенициллина) и ингибиторов клеточного роста (Guillard, 2005).

6.3.8. Очистка с помощью ультрафиолетового облучения

Успешность использования этой процедуры определяется различиями между водорослями, гетеротрофными бактериями и вирусами в реакции на ультрафиолетовое облучение (УФО) и фотосинтетическую солнечную радиацию (ФСР). Восприимчивость к УФО является основным различием между этими организмами, хотя некоторые бактерии чрезвычайно устойчивы к облучению.

В основном действие УФО является результатом непосредственной абсорбции отдельных протонов специфическими молекулами. В случае повреждения или гибели происходит разрушение нуклеотидных последовательностей или нуклеиновых кислот.

Воздействие УФО может применяться в случаях, когда бактерии прикрепляются к более крупным клетками водорослей. Нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий менее защищены, поэтому они легче повреждаются и вызывают гибель этих организмов (Guillard, 2005).

6.3.9. Проверка загрязненности

Эти методики включают микроскопические исследования с использованием многочисленных приемов: светлого и темного поля, фазового контраста, эпииллюминантной флуоресценции. При соблюдении стерильности во время манипуляций, с помощью электронной микроскопии можно также обнаружить внутри- и внеклеточное загрязнение. «Плавающая» цитометрия является обычной процедурой для определения бактерий (Guillard, 2005).

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия «аксеничная культура».
2. Перечислите основные методы очистки водорослей.
3. Опишите последовательность очистки и изоляции одноклеточных водорослей.
4. В чем заключается особенность дифференциального центрифугирования как способа очистки водорослей?
5. Приведите примеры, когда исследователи смогли получить чистые культуры водорослей при помощи того или иного метода.
6. Опишите метод очистки водорослей путем многократного разведения.
7. Какие проблемы связаны с использованием антибиотиков для очистки культур водорослей?
8. Укажите границы применения ультрафиолетового облучения при культивировании водорослей.

ГЛАВА 7. ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР ВОДОРΟΣЛЕЙ

7.1. Значение коллекций культур водорослей

Коллекции водорослей имеют огромное научное и прикладное значение. Ведущие мировые коллекции водорослей являются не только своеобразными «банками» для хранения генофонда водорослей, но и ведущими научно-исследовательскими центрами. Эти коллекции имеют самое современное оборудование для изучения водорослей и обеспечены высококвалифицированными кадрами. Информацию о важнейших отечественных и зарубежных коллекциях культур водорослей можно найти в справочнике «Водоросли» (1989).

Для организации и функционирования коллекций микроводорослей необходимо соблюдать условия, описанные ниже.

Для сохранения культур водорослей обычным способом является постоянное поддержание в контролируемых условиях, наиболее приближенных к природным. Обычные постоянные пересевы сочетаются с использованием асептических микробиологических методик и включают в себя перемещение водорослей, находящихся в стационарной фазе роста, на свежую стерилизованную среду. Это позволяет получить метаболически активную культуру в короткие сроки. Целью этой процедуры является сохранение жизнеспособной, физиологически, морфологически и генетически репрезентативной популяции. Ключевым фактором, который должен приниматься во внимание, является то, что разный возраст субкультуры может обеспечивать различные стадии жизненного цикла.

Основным ограничением для постоянного посева является искусственность питательной среды и режима инкубации по сравнению с естественными экологическими условиями. В некоторых случаях лабораторные условия культивирования приводят к изменению морфологического статуса и физиологических черт. В качестве примеров в этой связи можно привести уменьшение размера диатомовых водорослей (Jaworski et al., 1988). Другим лимитирующим фактором является возможность загрязнения аксеничных культур, неправильного этикетирования и других ошибок при культивировании. Для поддержания жизнеспособности многих штаммов необходимы постоянные пересевы, требующие больших затрат времени и расходных материалов. Средством, позволяющим преодолеть недостатки обычного культивирования, является развитие методов сохранения водорослей и цианобактерий, особенно методика криопрезервации.

Ниже мы рассмотрим основные моменты, необходимые для успешного долговременного культивирования, включая методики посева, условия культивирования, контроля качества культур. Основы

культивирования водорослей остаются неизменными в последние десятилетия (Pringsheim, 1946; Day, 1999; Richmond, 2004). В последнее время появилось новое оборудование, однако все эти процедуры до последнего времени успешно выполнялись вручную.

Многочисленные учреждения и институты занимаются культивированием водорослей. Эти организации можно подразделить на следующие категории:

- коллекции для образования и исследований;
- коллекции с хорошо идентифицированными видами и штаммами для исследований или практических целей;
- коллекции с генетически идентифицированными и постоянными штаммами для молекулярных исследований, биотехнологии и т.д.

Кроме того, многие исследователи имеют свои собственные коллекции из водорослей, полученных из других коллекций или выделенные из природы (Lorenz et al., 2005).

7.2. Организация функционирования коллекций культур

7.2.1. Методики пересева

Перед началом пересева необходимо тщательно проверить этикетки во избежание ошибок. Лучше всего снабдить этикетками посуду и стерильные среды перед пересевом. После этикетирования пробирки с пересеянными культурами должны быть организованы в том же порядке, что и культуры перед пересевом.

Во время пересева необходимо соблюдать условия стерильности. Пересев необходимо проводить в стерильном боксе или специальной комнате для пересева, если это возможно. Все оборудование должно быть предварительно стерилизовано. Контейнеры должны легко открываться для уменьшения риска загрязнения. Оборудование для пересева должно иметь горелку, микробиологическую петлю, специальный крючок или пинцет для пересева нитчатых водорослей, а также одноразовые петли и пипетки. Пересев жидкой культуры может проводиться путем разливания среды или с использованием пипеток. Пипетки должны иметь ватную пробку на конце и быть стерильными. Не рекомендуется использовать резиновые наконечники для пипеток, так как они могут быть загрязненными. Ватная пробка препятствует попаданию загрязнителей в культуру (Lorenz et al., 2005).

7.2.2. Пересев агаризованной среды

При пересеве колоний водорослей на агар микробиологическую петлю стерилизуют в пламени горелки до накаливания, затем, остудив, перемещают колонии водорослей. При посеве на чашки Петри крышку чашки только слегка приподнимают для предотвращения загрязнения. При посеве в пробирки или колбы посуду открывают вблизи пламени горелки. Если происходит пересев в несколько пробирок, крышки пробирок нужно слегка ослабить перед пересевом. Концентрация водорослей во вновь переселенной культуре обычно составляет 1-10% в объемном отношении. При пересеве на косяки с агаром посевной материал нужно перемещать от основания косяка к вершине. Это важно для того, чтобы вновь посеянные клетки хорошо освещались. Необходимо помнить, что при многократном использовании микробиологическая петля должна стерилизоваться перед каждым применением. На агаровых чашках большинство водорослей могут жить на поверхности или внутри агара (некоторые цианобактерии). Эти водоросли не могут пересеваться без частичек агара. Для очистки водорослей от старого агара может использоваться маленький скальпель. Можно также поместить кусочек водорослей вместе с твердой средой в жидкую на несколько часов, затем промыть водоросли и пересадить на новую среду с помощью пипетки.

При пересеве с агара на жидкую среду лучше всего отрезать маленький кусочек агара вместе с водорослями и поместить в жидкую среду. При пересеве с жидкой среды на твердую 2-3 капли среды вместе с водорослями помещаются на поверхность агара и распределяются стеклянной палочкой (Lorenz et al., 2005).

7.2.3. Пересев жидкой культуры

Осторожно поместить несколько капель или миллилитров среды в новую посуду, содержащую свежую среду. Горлышки колб и пробирок необходимо держать над пламенем. Необходимо иметь запас стерильной посуды на случай, если пробирка или колба разобьется. Для многих водорослей (зеленых коккоидных форм, цианобактерий), культуру необходимо перемешать, а затем пересадить. Однако энергичное перемешивание может разрушить некоторые водоросли (Lorenz et al., 2005).

7.2.4. Пересев нитчатых водорослей

Некоторые нитчатые водоросли могут быть пересажены с помощью пипетки или разливанием на агаре, в то время как другие требуют применения специальных методов. Иногда необходимо налить небольшое количество культуры в чашку с агаром, отрезать кусочек нити скальпелем и

только после этого поместить материал в жидкую среду (Lorenz et al., 2005).

7.2.5. Условия культивирования

Поддержание метаболически активных культур водорослей основано на решении трех основных задач: сохранении запасных культур, достижении специального морфологического и физиологического статуса и массовое культивирование (> 200 мл жидкости). Достижение указанных целей возможно при создании необходимых условий для оптимального роста, которые различаются в зависимости от вида. Однако для хранения культур необходимы субоптимальные температура и интенсивность света, эти факторы сходны для разных водорослей. В этом случае основной целью является сокращение числа пересевов путем удлинения интервалов между ними. Достижению этой цели способствует также применение специальных сред, способствующих удлинению интервала между пересевами. Вновь пересеянная культура часто инкубируется в оптимальных условиях в течение короткого времени до достижения необходимой биомассы и восстановления штамма, после чего она помещается в субоптимальные условия (Lorenz et al., 2005).

7.2.6. Выбор среды культивирования

Некоторые водоросли плохо адаптируются к специфическим питательным средам в условиях стресса и в конечном итоге могут изменить свою морфологию. В качестве примеров можно привести потерю колониального статуса вольвоксовых водорослей и водорослей рода *Pediastrum*, потерю жгутиков хламидомонадами, а также утрату специфических черт оболочки некоторыми цианобактериями. В течение длительного культивирования, в условиях, очень резко отличающихся от естественных, может происходить отбор генетических форм, приспособленных к искусственным условиям. Например, при культивировании в среде с высоким содержанием азота у цианобактерий может уменьшиться количество или даже наблюдается отсутствие гетероцистов.

Культуры водорослей могут очень сильно измениться со временем даже при сохранении условий культивирования и достатке всех необходимых элементов. Например, pH культуры очень часто изменяется без необходимого буфера, и некоторые микроэлементы окисляются или изменяются, особенно при искусственном освещении.

При использовании различных агаризованных сред, качество и чистота компонентов для среды играет важную роль для роста водорослей. В

случае применения некачественных компонентов для среды жизнеспособная культура может внезапно погибнуть.

Одним из важных моментов при культивировании водорослей является следующий: какая среда (жидкая или агаризованная) лучше подходит для долгосрочного культивирования водорослей? Выбор среды определяется многими факторами. Твердая среда предпочтительнее, так как она легче в обращении и менее подвержена загрязнению. Однако многие фллагеллаты и другие планктонные организмы плохо растут на агаре, в то время как многие почвенные и бентосные водоросли хуже культивируются на жидкой среде. Эти факты демонстрируют важность понимания специфики естественных условий обитания для организмов.

Другим важным моментом, на который необходимо обратить внимание, является выбор: какая среда (минеральная или с добавлением органических веществ) лучше подходит для длительного культивирования? Неаксеничные фотоавтотрофы желательно культивировать на минеральной среде для предотвращения загрязнения гетеротрофными контаминантами. С другой стороны, штаммы, которые должны культивироваться строго аксенично, иногда лучше выращивать в присутствии органических добавок для того, чтобы нефотосинтезирующие контаминанты могли быть выявлены сразу после загрязнения культуры. Добавление органических веществ или витаминов (B_1 – тиамина или B_{12} – цианокобаламина) часто помогает вернуть жизнеспособность культуре. Хорошему росту в течение длительного времени также способствует двухфазная среда, содержащая воду и почву (особенно для нитчатых зеленых и *Euglenophyta*). Добавление почвенного экстракта также помогает вернуть измененный морфологический статус.

Крупные коллекции водорослей имеют многочисленные культуры водорослей, поэтому необходимо использовать разнообразные питательные среды. Для облегчения работы, при длительном культивировании зачастую используются стандартные среды (Lorenz et al., 2005).

Разнообразные прописи питательных сред, рекомендуемых для тех или иных групп водорослей, можно встретить в многочисленных статьях и обзорах (Почвенные водоросли, 1969; Масюк, 1973; Сиренко и др., 1975; Культивирование..., 1983; и др.). Прописи сред, наиболее широко используемых в практике культивирования водорослей, указаны в Приложении 1 данного пособия.

7.2.7. Свет и температура

Установлено, что стандартная интенсивность света $10\text{--}30 \mu\text{моль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ в комбинации с соответствующей температурой подходят для большинства таксонов водорослей. Использование избыточного освещения является наиболее распространенной ошибкой при

долговременном культивировании. Другой проблемой может быть чрезмерно высокая температура. Чередование света и темноты необходимо для поддержания многих культур. Многие водоросли могут погибнуть в условиях постоянного освещения. В большинстве коллекций чередование света и темноты осуществляется в режиме 12:12ч или 16:8ч. Неподходящие режимы чередования света и темноты могут привести к нежелательным фотопериодическим эффектам (например, формированию цист).

Водоросли с фикобилисомами предпочитают низкий уровень освещенности (меньше $10 \mu\text{моль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$). Другие водоросли (например, большинство динофлагеллят) нуждаются в свете более высокой интенсивности (более $60\text{-}10 \mu\text{моль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$). Бесцветные водоросли (*Astasia*, *Polytomella*, *Prototheca*) лучше хранить в закрытой посуде.

Температура является очень важным фактором и должна строго контролироваться. Условия культивирования могут различаться в пределах одного департамента или лаборатории, но они должны периодически проверяться. В основном, температура должна поддерживаться на уровне $\pm 2^\circ\text{C}$. Пресноводные водоросли более толерантны к изменению температуры, чем морские виды. Многие пресноводные виды могут успешно культивироваться при $t=15\text{-}20^\circ\text{C}$. Однако некоторые крупные коллекции культур (например, Culture Collection of Algae at the University of Texas – UTEX) культивирует все штаммы при $t=20^\circ\text{C}$. Инкубирование при температуре выше 20°C должно сопровождаться увеличением интенсивности света для предотвращения фотоингибирования и повреждения. Поэтому температура выше 20°C не подходит для культивирования большинства водорослей. Кроме того, при повышении температуры увеличивается и интенсивность испарения (Lorenz et al., 2005).

7.2.8. Частота пересевов

При постоянном культивировании основной целью является сохранение организма в конце экспоненциальной фазы роста. В большинстве крупных коллекций культур наименее коротким интервалом между пересевами является интервал в 1-2 недели, и этот режим пересевов поддерживается для очень незначительного числа чувствительных штаммов. Некоторые штаммы зеленых водорослей и цианобактерий, культивируемые на косяках при низкой освещенности и при $t=10^\circ\text{C}$, пересаживаются один раз в 6 месяцев. Оптимальным интервалом для пересаживания является одна четверть времени, в течение которого водоросль может жить на среде без пересаживания (Lorenz et al., 2005).

7.2.9. Определение оптимальных условий культивирования для новых изолятов

Вновь изолированные штаммы вызывают определенные сложности при культивировании, так как неизвестны оптимальные условия для их поддержания. Для определения оптимальных условий культивирования необходимо провести тест, выращивая культуру при различной освещенности и температуре (начиная с самых низких уровней). Необходимо постоянно записывать данные об условиях выращивания, это важно для дальнейшего культивирования. Иногда случается, что культура хорошо растет при разных условиях, а затем внезапно погибает. Это зачастую происходит тогда, когда водоросль растет на искусственной среде или при недостатке некоторых факторов роста (микроэлементы, витамины). Поэтому можно рекомендовать выращивать новую культуру на различных средах: если водоросль погибнет в одной среде, она может выжить на других (Lorenz et al., 2005).

7.2.10. Установки для культивирования

Культуры водорослей должны равномерно освещаться. Водоросли лучше растут в колбах, однако они занимают больше места. Пробирки для культивирования должны быть достаточно широкими, что более удобно при пересеве культуры. Многоразовые крышки более удобны, но их нужно стерилизовать перед применением. Некоторые представители *Conjugatorhuseae* и большинство планктонных пресноводных диатомей лучше культивируются в колбах Эрленмейера, некоторые динофлагелляты лучше растут в пластиковых колбах.

Крышки должны плотно закрываться для предотвращения загрязнения. Могут использоваться стеклянные, металлические, пластиковые крышки или ватные пробки. Ватные пробки нужно заворачивать в металлическую фольгу или водонепроницаемую бумагу для предотвращения испарения. При использовании парафильма может наблюдаться развитие грибов. Лучше всего использовать силиконовые крышки, так как они очень плотно закрываются и предотвращают испарение без затруднения газообмена (Lorenz et al., 2005).

7.2.11. Оборудование и условия, необходимые для постоянного культивирования

Специальное оборудование для культивирования варьирует от простых полок для северного окна и освещенных инкубаторов, до специальных комнат для культивирования (рис. 21,22). Обычно комната с регули-

руемыми условиями хорошо подходит для небольшого числа культур. Для больших коллекций хорошо подходят специальные инкубаторы, но они очень дороги в эксплуатации. Холодильники с прозрачными дверцами, которые используются в продовольственных магазинах, могут быть более дешевой альтернативой таких инкубаторов.



Рис. 21. Комната для культивирования водорослей в Университете Джона Кэрролла (США)

Стойки и полки должны обеспечивать равномерное освещение и температурный контроль и быть легкодоступными. Различное число культур должно храниться вместе на специальных тестовых стойках. Полки должны быть изготовлены из стекла или металла, так как их легко обрабатывать для стерилизации. Наиболее оптимальны полки из металлической сетки, так как они обеспечивают хорошую циркуляцию воздуха. Источники света должны располагаться над или в стороне от полок для предотвращения перегрева.

Для культивирования водорослей нужно поддерживать определенную температуру. Лучше всего расположить компрессоры вне здания. В целях индикации изменения температуры более чем на 2-4°C можно использовать специальные звуковые системы.

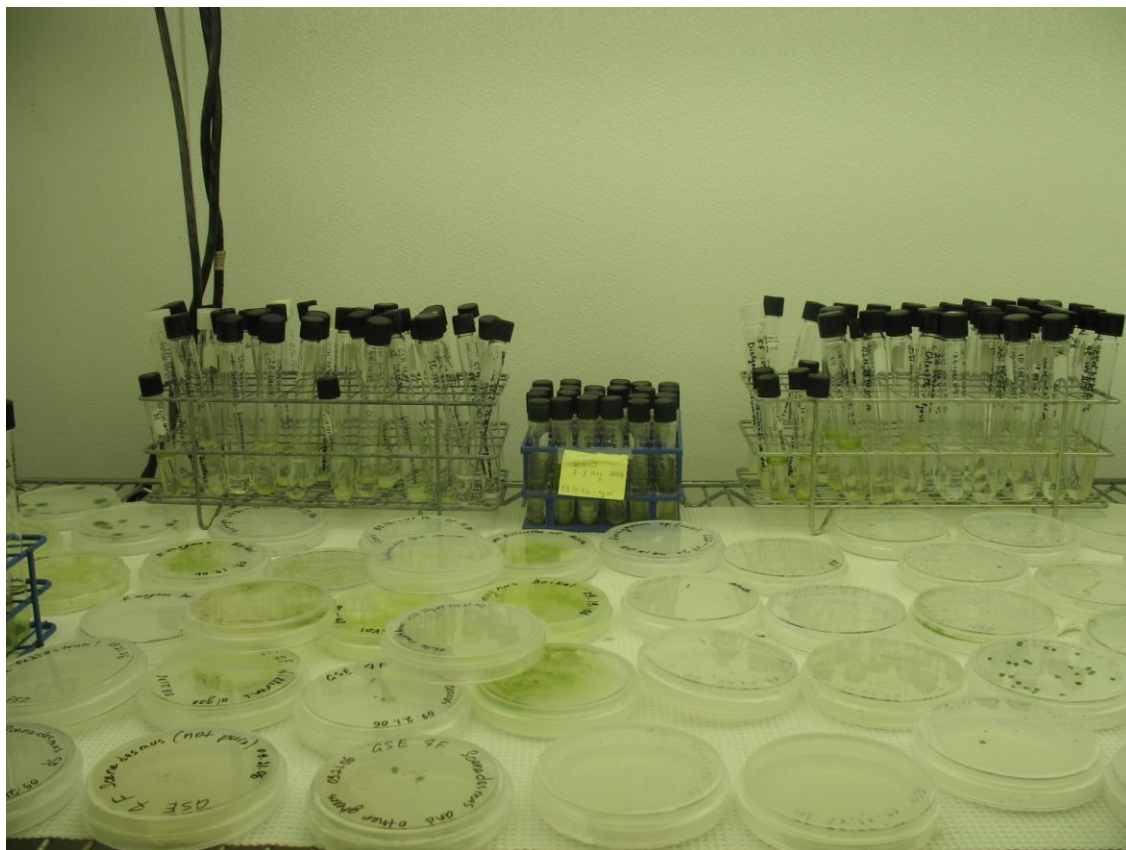


Рис. 22. Изоляты водорослей в комнате для культивирования в Университете Джона Кэрролла (США)

Для освещения культур лучше всего использовать рассеянный свет. Попадание прямого солнечного света может привести к чрезмерному нагреванию и гибели культуры.

При культивировании водорослей также необходимо поддерживать определенную влажность. Это необходимо не только для предотвращения чрезмерного испарения, но и для предотвращения загрязнения водорослей. Например, споры грибов хорошо развиваются при влажности воздуха 60% и выше.

Поддержание чистоты в культуральных помещениях является важным условием культивирования. Все поверхности должны обрабатываться 70% раствором этанола. Полевые образцы, почва и другие биологические материалы должны храниться отдельно от культур водорослей (Lorenz et al., 2005).

7.2.12. Поддержание порядка в хранении культур

Для долговременного хранения культур водорослей должна существовать специальная система этикетирования. Нумерация штаммов является наиболее простым и эффективным средством поддержания порядка. Названия видов и родов могут изменяться (при применении более точной идентификации), но номер штамма должен быть постоянным. Можно рекомендовать следующую информацию для этикетки: научное название вида, номер штамма, среда культивирования. Одновременное использование названия вида и номера штамма снижает риск ошибки. Для небольших коллекций можно рекомендовать также дату пересева. Дополнительную информацию о каждом штамме можно указать в базах данных и картотеке.

Этикетки должны быть легко читаемыми, водостойкими и легкими для замены.

Для снижения риска потери штамма культуру следует хранить как минимум в двух повторностях. Можно рекомендовать следующий порядок хранения культуры: 2 пробирки после последнего пересева, 2 пробирки из предпоследнего пересева и 1 пробирку из более ранних пересевов для медленного роста хранить отдельно (Lorenz et al., 2005).

Контрольные вопросы

1. Какова роль коллекций культур водорослей в современной биологии?
2. Перечислите условия, необходимые для функционирования коллекций культур водорослей.
3. Чем обусловлен выбор среды для культивирования?
4. Какие уровни освещенности и температуры являются оптимальными для сохранения жизнеспособности водорослей?
5. С какой частотой необходимо пересаживать водоросли?
6. Какое оборудование используется для культивирования водорослей?
7. Как поддерживается порядок в хранении культур?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Водоросли. Справочник / Вассер С.П. и др. Киев: Наук. Думка, 1989. 608 с.

Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: в 3-х т.Т.1: Пер.с англ./ Под ред.Р.Сопера. М.: Мир, 1996. 368 с.

Культивирование коллекционных штаммов водорослей / Под ред. Б.В.Громова. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1983. 152 с.

Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. Киев: Наук. думка, 1973. 244 с.

Почвенные водоросли. Голлербах М.М., Штина Э.А. Л.: Изд-во Наука, 1969. 228 с.

Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 248 с.

Теппер Е.З, Шильникова В.К, Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1993. 175 с.

Aghajanian J. G. A starch grain-mitochondrion-dictyosome association in *Batrachospermum* (Rhodophyta) // J. Phycol. 1979. Vol. 15. P. 230-232.

Allen E. A. D., Gorham P. R. Culture of planktonic cyanophytes on agar / Carmichael W. W. The Water Environment: Algal Toxins and Health. Plenum Publishing Corp., New York. 1981. P. 185-192.

Allen E. J. On the culture of the plankton diatom *Thalassiosira gravida* Cleve, in artificial sea-water // J. Mar.Biol. Assoc. U. K. 1914. Vol. 10. P. 417-39.

Allen M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates // J. Phycol. 1968. Vol. 4. P.1-4.

Allen M. M., Stanier R. Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae // J. Gen. Microbiol. 1968. Vol. 51. P. 199-202.

Allen M.M. Methods for cyanophyceae / Steain J.R. Handbook of Phycolological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge. 1973. P. 127-38.

Andersen R. A., Morton S. L., Sexton J. P. CCMP – Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton. List of strains // J. Phycol. 1997. Vol. 33. P. 1-75.

Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. Recipes for freshwater and seawater media / Andersen R.A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 429-538.

Andersen R.A., Kawachi M. Traditional microalgae isolation techniques / Andersen R.A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 82-100.

Anderson D. M., Fukuyo Y., Matsuoka K. Cyst Methodologies / Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris, 1995. P. 229-249.

Bischoff H. W., Bold H. C. Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Species. University of Texas, Austin, 1963. Vol. 6318. P. 1-95.

Bold H. C. Notes on the culture of some common algae // J. Tenn. Acad. Sci. 1936. Vol. 11. P. 205-212.

Bold H. C. The cultivation of algae // Bot. Rev. 1942. Vol. 8. P. 69-138.

Bold H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. // Bull. Torrey Bot. Club. 1949. Vol. 76. P. 101-108.

Bold H. C. Twenty-five years of phycology (1947-1972) // Ann. Missouri Bot. Gard. 1974. Vol. 61. P. 14-44.

Boye M., van den Berg C. M. G. Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliana huxleyi* // Mar. Chem. 2000. Vol. 70. P. 277-287.

Brahamsha B. A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62. P. 1747-1751.

Brand L.E et al. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates // J. Plankton. Res. 1981. Vol. 3. P. 93-201.

Brook A. J. The discoloration of roofs in the United States and Canada by algae // J. Phycol. 1968. Vol. 4. P. 250.

Brown R. M., Jr., Bischoff H. W. A new and useful method for obtaining axenic cultures of algae // Phycol. Soc. Amer. News Bull. 1962. Vol. 15. P. 43-44.

Brunei J., Prescott G. W., Tiffany L. N. The Culturing of Algae. Charles F. Kettering Foundation, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1950. 114 p.

Burlew J. S. Algal culture: from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Washington, D. C, 1953. Vol. 600. P. 1-357.

Chick H. A study of a unicellular green alga, occurring in polluted water, with especial reference to its nitrogenous metabolism // Proc. Roy. Soc. 1903. Vol. 71. P. 458-476.

Chodat R. Les clones chez les algues inferieures. Zeitschr. Indukt. Abst.-Vererb. Suppl. / Verhandl. V. Internat. Kongr. Vererbungswiss., Berlin, 1927. Verlag Borntraeger, Leipzig, Germany. 1928. Vol. 1. P. 522-530.

Chodat R., Grintzesco J. Sur les méthodes de culture pure des algues vertes. Congrès International de Botanique, Paris. Extrait du Comptes Rendu. Imprimerie Lucien Declume, Lons-le-Saunier, France, 1900. P. 157-162.

Chu S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. Part I. Methods and culture media // J. Ecol. 1942. Vol. 30. P. 284-325.

Cohn S. A., Pickett-Heaps J. D. The effects of colchicines and dinitrophenol on the in vivo rates of anaphase A and B in the diatom *Surirella* // Eur. J. Cell Biol. 1988. Vol. 46. P. 523-530.

Cole G. T., Wynne M. J. Endocytosis of *Microcystis aeruginosa* by *Ochromonas danica*. J. Phycol. 1974. Vol. 10. P. 397-410.

Comtois P. Pierre Miquel: the first professional aerobiologist // Aerobiologia. 1997. Vol. 13. P. 75-82.

Darling R. B., Friedmann E. I., Broady P. A. *Heterococcus endolithicus* (Xanthophyceae) and other terrestrial *Heterococcus* species from Antarctica: Morphological changes during life history and response to temperature // J. Phycol. 1987. Vol. 23. P. 598-607.

Davies A.G. The effect of heavy metals upon natural marine phytoplankton populations // Progress in Phycological Research. 1983. Vol. 2. P. 45-113.

Day J.G. Conservation strategies for algae / Benson E.E. Plant Conservation Biotechnology. London: Taylor and Francis Ltd. 1999. P. 111-124.

Drew K. M. Conchocelis-phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. // Nature. 1949. Vol. 164. No. 4174. P. 748-749.

Droop M. R. A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure culture // J. Mar. Biol. Assoc. U. 1954. Vol. 33. P. 511-541.

Droop M. R. Terpenoid quinones and steroids in the nutrition of *Oxyrrhis marina* // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 1971. Vol. 51. P. 455-470.

Droop M. R., Doyle J. Ubiquinone as a protozoan growth factor // Nature. 1966. Vol. 212. No. 5069. P. 1474-1475.

Droop M.R. Algae / Norris J.R., Ribbon D.W. Methods on Microbiology. Vol 3B. New York: Academic Press, 1969. P. 269-313.

Erata M., Chihara M. Cryptomonads from the Sugadaira-Moor, Central Japan. Bull. Sugadaira Mont. Res. Center, Univ. Tsukuba, 1987. Vol. 8. P. 57-69.

Errécalde O., Campbell P. G. C. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate // J. Phycol. 2000. Vol. 36. P. 473-483.

Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1995. 721p.

Fellers C. R. The analysis, purification and some chemical properties of agar-agar // J. Indust. Engin. Chem. 1916a. Vol. 8. P. 1128-1133.

Floyd G. L., Stewart K. D., Mattox K. R. Cellular organization, mitosis, and cytokinesis in the ulotrichalean alga, *Klebsormidium* // J. Phycol. 1972. Vol. 8. P. 176-184.

Foerster J. W. The ecology of an elfin forest in Puerto Rico. 14. The algae of Pico Del Oeste // J. Arnold Arbor. 1971. Vol. 52. P. 86-109.

Fogg G. E. Algal cultures and phytoplankton ecology. Madison: University of Wisconsin Press, 1965. 126 p.

Fox C. H. Studies of the cultural physiology of the lichen alga *Trebouxia* // *Physiologia Plantarum*. 1967. Vol. 20. P. 251-262.

Føyn B. Lebenszyklus, Cytologic und Sexualität der Chlorophyceae *Cladophora suhriana* Kützinger // *Arch. Protistenk.* 1934. Vol. 83. P. 1-56.

Garbary D. J., Wynne M. J. Prominent Phycologists of the 20th Century. Lancelot Press, Hantsport, Nova Scotia, 1996. 360 p.

Gärtner G. ASIB: The Culture Collection of Algae at the Botanical Institute, Innsbruck // *Nova Hedwigia*. 2004. Vol. 79. P. 71-76.

Genesmer R. W. Role of aluminum and growth rate on changes in cell size and silica content of silica-limited populations of *Asterionella ralfsii* var. *americana* (Bacillariophyceae) // *J. Phycol.* 1990. Vol. 26. P. 250-258.

Guillard R. R. L. Culture methods / Hallegraeff G. M., Anderson D. M., and Cembella A. D. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. Paris: UNESCO, 1995. P. 45-62.

Guillard R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates / Smith W. L., Chanley M. H. Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, 1975. P. 26-60.

Guillard R. R. L., Lorenzen C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c // *J. Phycol.* 1972. Vol. 8. P. 10-14.

Guillard R.R.L. Purification methods for microalgae / Andersen R.A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 117-132.

Guillard R.R.L., Keller M. Culturing dinoflagellates 1984. Academic Press, New York. P. 391-442.

Guillard R.R.L., Morton S.L. Cultures methods. Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris: UNESCO, 2003. P. 77-79.

Harder R. Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen *Nostoc punctiforme* // *Zeitschr. Bot.* 1917. Vol. 9. P. 145-242.

Hartmann M. Untersuchungen über die Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Phytomonaden (Volvocales) IV // *Arch. Protistenk.* 1924. Vol. 49. P. 375-395.

Hassenteufel W., Jagitsch R., Koczy F. F. Impregnation of glass surface against sorption of phosphate traces. *Limnol. Oceanogr.* 1963. Vol. 8. P. 152-156.

Hoff F. H., Snell T. W. Plankton Culture Manual / Florida Aqua Farms, Inc., Dade City, Florida, USA, 2001. 162 p.

Holm-Hansen O. Viability of blue-green and green algae after freezing // *Physiol. Plant.* 1963. Vol. 16. P. 530-540.

Hoppenrath M. Morphology and taxonomy of six marine sand-dwelling *Amphidiniopsis* species (Dinophyceae, Peridiniales), four of them new, from the German Bight, North Sea // *Phycologia*, 2000. Vol. 39. P. 482-497.

Hoshaw R. W., Rosowski J. R. Methods for microscopic algae / Stein J. R. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. P. 53-68.

Hutner S. H., Provasoli L., Schatz A., Haskins C. P. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms // Proc. Amer. Phil. Soc. 1950. Vol. 94. P. 152-170.

Hutner S. H., Provasoli L., Stokstad E. L. R., Hoffmann C. E., Belt M., Franklin A. L., Jukes T. H. Assay of anti-pernicious anemia factor with *Euglena* // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1949. Vol. 70. P. 118-120.

Ichimura T. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum* / Nishizawa K., Arasaki S., Chihara M., Hirose H., Nakamura V., Tsuchiya Y. Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium, Sapporo, Japan, August 8-12, 1971. Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium, University of Tokyo Press, Tokyo, 1971. P. 208-214.

Jacobsen H. C. Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen // Zeitschr. Bot. 1910. Vol. 2. P. 145-188.

Jaworski G.H.M. Variability in sinking rate of freshwater diatom *Asterionella formosa*: the influence of colony morphology // Br. Phycol. J. 1988. Vol. 23. P. 167-176.

Jones G. E. Precipitates from autoclaved seawater // Limnol. Oceanogr. 1967. Vol. 12. P. 165-167.

Kato S. Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrb. (Euglenophyceae) // Jap. J. Phycol. 1982. Vol. 30. P. 63-67.

Kawachi M., Noël M.H. Sterilization and sterile technique / Andersen R.A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 65-82.

Keller M. D., Bellows W. K., Guillard R. R. L. Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1988. Vol. 117. P. 279-283.

Komagata K., Sugawara H., Ugawa Y. World Catalog of Algae, Second Edition. WFCC World Data Center on Microorganisms. Life Science Research Information Section, RIKEN, Wako, Saitama, Japan. 1989. 315 p.

Krieg N. R., Gerhardt P. Solid culture / Gerhardt P., Murray R. G. E., Costilow R. N et al. Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1981. P. 143-144.

Krüger W. Beiträge zur Kenntnis der Organismen des Saftflusses (sog. Schleimflusses) der Laubbäume. I. Über einen neuen Pilztypus, repräsentiert durch die Gattung *Prototheca*; II. Über zwei aus Saftflüssen rein gezüchtete Algen / Zopf W. Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen. Arthur Felix, Leipzig, Germany. 1894. Vol. 4. P. 69-116.

Küster E. Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen (1. Auflage). Leipzig: Verlag B. G. Teubner, 1907. 201 p.

Kufferath H. La culture des algues // *Revue Algol* 1928/29. Vol. 4. P. 127-346.

Kugrens P., Lee R. E., Andersen R. A. Ultrastructural variations in cryptomonad flagella // *J. Phycol.* 1987. Vol. 23. P. 511-518.

Leal M. F. C., Vasconcelos M. T. S. D., van den Berg C. M. G. Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliana huxleyi* in seawater cultures // *Limnol. Oceanogr.* 1999. Vol. 44. No 7. P. 1750-1762.

Lewin J. Silicon metabolism in diatoms, V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth // *Phycologia*. 1966. Vol. 6. P. 1-12.

Lewin R.A. The isolation of algae // *Rev. Algol.* (new series). 1959. Vol. 3. P. 181-197.

Li R., Yokota A., Sugiyama J., Watanabe M., Hiroki M., Watanabe M. M. Chemotaxonomy of planktonic cyanobacteria based on non-polar and 3-hydroxy fatty acid composition // *Phycol. Res.* 1998. Vol. 46. P. 21-28.

Lim M. et al. A method of obtaining axenic cultures of *Trentopodia* spp. (Chlorophyta) // *J. Phycol.* 1992. N 28. P. 567-569.

Lorenz M., Friedl T., Day J.G. Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures / Andersen R.A. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, 2005. P. 145-156.

Lwoff A. La nutrition de *Polytoma uvella* Ehrenberg (Flagellé Chlamydomonadinae) et le pouvoir de synthèse des protistes hétérotrophes. Les protistes mésotrophes // *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1929. Vol. 188. P. 114-116.

Lwoff A. Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires. Le pouvoir de synthèse. Monographies de l'Institut Pasteur. Masson, Paris, 1932. 158 p.

Lwoff A. Sur la nutrition des Infusoires // *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1923. Vol. 176. P. 928-930.

Matsuoka K., Fukuyo Y. Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study. Westpac-HAB, Nagasaki University, Nagasaki, Japan, 2000. 29 p.

McLachlan J., Chen L. C.-M., Edelstein T. The culture of four species of *Fucus* under laboratory conditions // *Can. J. Bot.* 1971. Vol. 9. P. 1463-1469.

Meier F. Cultivating algae for scientific research // *Ann. Rep. Board Regents Smithsonian Inst.* 1932. Vol. 1932. P. 373-383.

Miquel P. De la culture artificielle des Diatomées // *Le Diatomiste*. 1890/92. Vol. 173-5, 93-9, 121-8, 149-56, 165-172.

Moore G. T. Methods for growing pure cultures of algae // *J. Appl. Microsc. Labor. Meth.* 1903. Vol. 6. P. 2309-2314.

Morel F. M. M., Westall J. C., Reuter J. G., Chaplick J. P. Description of the algal growth media "Aquil" and "Fraquil." Technical Report 16. Water Quality Laboratory, Ralph Parsons Laboratory for Water Resources and Hydrodynamics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, 1975. 33 p.

Nelson D.M., Brand L.E. Cell division periodicity in 13 species of marine phytoplankton on a light : dark cycle // *J. Phycol.* 1979. Vol. 15. P. 67-75.

Otsuki A., Watanabe M. M., Sugahara K. Chlorophyll pigments in methanol extracts from ten axenic cultured diatoms and three green algae as determined by reverse phase PIPLC with fluorometric detection // *J. Phycol.* 1987. Vol. 23. P. 406-414.

Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures // *Nature*. 1949. Vol. 164. No. 4172. P. 666.

Preisig H.R., Andersen R.A. Historical review of algal culturing techniques / Andersen R.A. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, 2005. P. 1-12.

Price N. M., Harrison G. I., Hering J. G, Hudson R. J., Nirel P. M., Palenik B., Morel F. M. M. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium // *Aquil. Biol. Oceanogr.* 1989. Vol. 6. P. 443-461.

Price N.M et al. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium // *Aquil. Biol. Oceanogr.* 1988/89. Vol. 6. P. 61-443.

Pringsheim E. G. *Algenkultur* / Abderhalden E. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. XI (2/1). Urban und Schwarzenberg, Berlin, 1924. P.377-406.

Pringsheim E. G. Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. Mitt. I / *Die Kultur von Algen in Agar*. Beitr. Biol. Pfl. 1912. Vol. 11. P. 305-334.

Pringsheim E. G. The soil-water culture technique for growing algae / Brunei J., Prescott G. W., Tiffany L.H. *The Culturing of Algae*. Charles E. Kettering Foundation, Dayton, Ohio, 1950. P. 19-26.

Pringsheim E.G. *Pure Cultures of Algae. Their Preparation and Maintenance*. Cambridge University Press, Cambridge. London, 1946. 119 p.

Provasoli L. Alcune considerazioni sui caratteri morfologici e fisiologici delle Alghe // *Boll. Zool. Agrar. Bachicolt.* Milano, 1956. Vol. 22. P. 143-88.

Provasoli L. Effect of plant hormones on *Ulva* // *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*. 1958a. Vol. 114. P. 375-384.

Provasoli L. Nutrition and ecology of protozoa and algae // *Ann. Rev. Microbiol.* 1958b. Vol. 12. P. 279-308.

Provasoli L., Carlucci A. F. Vitamins and growth regulators / Stewart W. D. P. *Algal Physiology and Biochemistry*. London: Blackwell Scientific, 1974. P. 741-787.

Provasoli L., Hutner S. H., Schatz A. Streptomycin-induced chlorophyll-less races of *Euglena* // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948. Vol. 69. P. 279-282.

Provasoli L., McLaughlin J. J. A., Droop M. R. The development of artificial media for marine algae // *Arch. Mikrobiol.* 1957. Vol. 25. P. 392-428.

Provasoli L., McLaughlin J. J. A., Pintner I. J. Relative and limiting concentrations of major mineral constituents for the growth of algal flagellates. *Trans. New York Acad. Set. Ser. II*. 1954. Vol. 16. P. 412-417.

Provasoli L., Pintner I. J. Artificial media for freshwater algae: Problems and suggestions / Tryon C. A., Jr., Hartman R. T. The Ecology of Algae. Special Publication 2. Pymatuning Laboratory of Field Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, 1960. P. 84-96.

Reardon E. M., Price C. A., Guillard, R. R. L. Harvest of marine microalgae by centrifugation in density gradients of 'Percoll' / Reid E. Cell Populations. Methodological Surveys (B) Biochemistry. Vol. 8. John Wiley & Sons, New York, 1979. P. 171-175.

Richmond A. CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986. 528 p.

Richmond A. Handbook of microalgal culture-biotechnology and applied phycology. Malden: Blackwell Publishing, 2004. 556p.

Richter O. Die Reinkultur und die durch sie erzielten Fortschritte vornehmlich auf botanischem Gebiete // Progressus rei Botanicae. 1913. Vol. 4. P. 303-360.

Rippka R. et al. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principals // The Prokaryotes. Vol. 1. Vienna: Springer-Verlag, 1981. P. 20-212.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. 1979. Vol. 111. P. 1-61.

Rogerson A., De Freitas A. S. W., McInnes A. C. Observations on wall morphogenesis in *Coscinodiscus asteromphalus* (Bacillariophyceae) // Trans. Am. Microsc. Soc. 1986. Vol. 105. P. 59-67.

Rosowski J. R., Kugrens P. Observations on the euglenoid *Colacium* with special reference to the formation and morphology of attachment material // J. Phycol. 1973. Vol. 9. P. 370-383.

Round F. E. The Ecology of Algae. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 653 p.

Rueter J. G., Ades D. R. The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) // J. Phycol. 1987. Vol. 23. P. 452-457.

Rueter J. G. Iron stimulation of photosynthesis and nitrogen fixation in *Anabaena* 7120 and *Trichodesmium* (Cyanophyceae) // J. Phycol. 1988. Vol. 24. P. 249-254.

Sauvageau C. Sur la sexualité hétérogamique d'une Laminiaire (*Saccorhiza bulbosd*) // C. R. Acad. Sci., Paris, 1915. Vol. 161. P. 796-799.

Schlegel I., Krienitz L., Hepperle D. Variability of calcification of *Phacotus lenticularis* (Chlorophyta, Chlamydomonadales) in nature and culture // Phycologia. 2000. Vol. 39. P. 318-322.

Schlichting H. E., Jr. A preliminary study of the algae and protozoa in seafoam // Bot. Mar. 1971. Vol. 14. P. 24-28.

Schlichting H. E., Jr. Some subaerial algae from Ireland // Br. Phycol. J. 1975. Vol. 10. P. 257-261.

Schlichting H. E., Jr. The importance of airborne algae and protozoa // J. Air Poll. Control Assoc. 1969. Vol. 19. P. 946-951.

Schlichting H. E., Jr., Milliger L. E. The dispersal of microorganisms by a hemipteran, *Lethocerus uhleri* (Montandon) // Trans. Atner. Microsc. Soc. 1969. Vol. 88. P. 452-454.

Schlichting H. E., Jr., Raynor G. A., Solomon W. R. Recommendations for Aerobiology Sampling in a Coherent Monitoring System: Algae and Protozoa in the Atmosphere. U.S./ IBP Aerobiology Handbook No. 3. Michigan: University of Michigan, Ann Arbor, 1971. P. 60-61.

Schlösser U. G. SAG—Sammhmg von Algenkulturen at the University of Göttingen catalogue of strains 1994 // Bot.Acta. 1994. Vol. 107. P. 111-186.

Schreiber E. Die Reinkultur von marinem Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meereswassers. Wiss. Meeresuntersuch //Abt. Helgoland N. F. 1927. Vol. 16. No.10. P. 1-34.

Schultz M. E., Trainor F. R. Production of malegametes and auxospores in the centric diatoms *Cyclotella meneghiniana* and *C. cryptic* // J. Phycol. 1968. Vol. 4. P. 85-88.

Schuster A. M., Waddle J. A., Korth K., Meints R. H. Chloroplast genome of an exsymbiotic *Chlorella*-like green alga // Plant Mol. Biol. 1990. Vol. 14. P. 859-862.

Shirai M., Matsumaru K., Ohtake A., Takamura Y., Aida T, Nakano M. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria) // Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55. P. 2569-2571.

Sitz T.O., Schmidt R.R. Purification of *Synechococcus lividus* by equilibrium centrifugation and its synchronization by different centrifugation // J.Bact. 1973. Vol. 115. P. 43-46.

Skinner C. E. Isolation in pure culture of green algae from soil by a simple technique // Plant Physiol. 1932. Vol. 7. P. 533-537.

Smith P. E. The effects of some air pollutants and meteorological conditions on airborne algae and protozoa // J. Air Poll. Control Assoc. 1973. Vol. 23. P. 876-880.

Soeder C. J. An historical outline of applied algology / Richmond A. CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1986. P. 25-41.

Solp H., Starr M.P. Principles of isolation, cultivation and conservation of bacteria / The Procaryotes. Vol. 1. Vienna: Springer-Verlag, 1981. P. 135-175.

Soma Y., Imaizumi T., Yagi K., Kasuga S. Estimation of algal succession in lake water using HPLC analysis of pigments // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1993. Vol. 50. P. 1142-1146.

Starr R. C., Zeikus J. A. UTEX: the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. 1993 List of cultures // J. Phycol. 1993. Vol. 29. N. 2. P. 1-106.

Starr R. C. Culture Collection of Algae at Indiana University // *Lloydia*. 1956. Vol. 19. P. 129-156.

Stein J. R. Handbook of Phycological Methods. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. 448 p.

Stokes P.M. Responses of freshwater algae to metals // *Progress in Phycological Research*. Vol. 2. New York: Elsevier, 1983. P. 87-112.

Suda S., Watanabe M. M., Otsuka S., Mahakhant A., Yongmanitchai W., Noparatnaraporn N., Liu Y., Day J. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria // *Int. J. Syst. E. Vol. Microbiol.* 2002. Vol. 52. P. 1577-1595.

Sutherland J.W. Ultrasonication – an enrichment technique for microcyst-forming bacteria // *J. Appl. Bacteriol.* N. 41. P. 8-185.

Takamura N., Kasai E., Watanabe M. M. The effects of Cu, Cd, and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae // *J. Appl. Phycol.* 1988. Vol. 1. P. 39-52.

Takamura N., Kasai F., Watanabe M. M. Unique response of Cyanophyceae to copper // *J. Appl. Phycol.* 1989. Vol. 2. P. 293-296.

Tamiya H. Synchronous cultures of algae // *Annual Rev. Plant Physiol.* 1966. Vol. 17. P. 1-26.

Terumoto I. Frost resistance in the marine alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. // *Low Temp. Sci. Ser. B*. 1961. Vol. 19. P. 23-28.

Thomas D. L., Montes J. G. Spectrophotometrically assayed inhibitory effects of mercuric compounds of *Anabaena flos-aquae* and *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae) // *J. Phycol.* 1978. Vol. 14. P. 494-499.

Thronsdon J. Special methods – micro-manipulators // *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. P. 38-45.

Thronsdon J. The dilution-culture method / Sournia A. *Phytoplankton Manual*. Paris: UNESCO, 1978. P. 218-224.

Toledo G., Palenik B. *Synechococcus* diversity in the California current as seen by RNA polymerase (rpoC1) gene sequences of isolated strains // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 4298-4303.

Tompkins J., DeVille M. M., Day J. G., Turner M. E. Culture Collection of Algae and Protozoa. Catalog of Strains. Ambleside, UK, 1995. 204 p.

Tseng C. K. Commercial cultivation / Lobban C. S., Wynne M. J. *The Biology of Seaweeds*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981. P. 680-725.

Uhling G. Eine einfache Methode zur Extraktion der vagilen, mesopsamalen Mikrofauna // *Helgoländer wiss. Meeres.* 1964. Vol. 11. P. 178-185.

Uspenski E. E., Uspenskaja W.J. Reinkultur und ungeschlechtliche Fortpflanzung des *Volvox minor* und *Volvox globator* in einer synthetischen Nährlösung // *Zeitschr. Bot.* 1925. Vol. 17. P. 273-308.

Venkataraman G S. *The Cultivation of Algae*. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1969. 319 p.

Vischer W. Die Kultur der Heterokonten / Rabenhorsts Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Vol. 11 (ed. 2). Heterokonten. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Germany, 1937. P. 190-201.

Vischer W. Études d'algologie expérimentale. Formation des stades unicellulaires, cénobiaux et pluricellulaires chez les genres *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Coelastrum*, *Stichococcus* et *Pseudendoclonium* // Bull. Soc. Bot. Geneve Ser. 2, 1926. Vol. 18. P. 184-245.

Vischer W. Reproduktion und systematische Stellung einiger Rinden- und Bodenalgae // Schweiz. Zeitschr. Hydrol. 1960. Vol. 22. P. 330- 349.

Wall D., Guillard R. R. L, Dale B. Marine dinoflagellate cultures from resting spores // Phycologia. 1967. Vol. 6. P. 83-86.

Watanabe M. M., Kawachi M., Hiroki M., Kasai E. NIES – Collection List of Strains, Sixth Edition, 2000, Microalgae and Protozoa. Microbial Culture Collections, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan, 2000. 159 p.

Watanabe M. M., Nakagawa M., Katagiri M., Aizawa K., Hiroki M., Nozaki H. Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in "ultra-low-gelling-temperature agarose" // Phycol. Res. 1998. Vol. 46 P. 71-75.

Watanabe M. M., Takeuchi Y., Takamura N. Cu tolerance of freshwater diatom, *Achnanthes minutissima* / Yasuno M., Whitton B. A. Biological Monitoring of Environmental Pollution. Tokyo: Tokai University Press, 1987. P. 171-177.

Watanabe M.M. Freshwater culture media / Andersen R.A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 13-20.

Watanabe M.M. et al. Axenic cultures of three species of *Microcystis* (Cyanophyta=Cyanobacteria) // Bull. Jap. Fed. Culture Coll. 1985. N1. P. 57-63.

Watanabe M.M., Nakagawa M., Katagiri M., Aizawa K., Hiroki M., Nozaki H. Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in "ultra-low-gelling-temperature agarose" // Phycol. Res. 1998. N. 46. P. 71-75.

Waterbury J. V., Watson S. W., Valois E. W., Franks D. G. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* / Piatt T, Li W. K. W. Photosynthetic Picoplankton. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 1986. Vol. 214. P. 171-120.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Прописи питательных сред, рекомендуемых для культивирования различных групп водорослей

Основная среда Болда (Bold's Basal Medium–BBM)

(Bold, 1949; Bischoff, Bold, 1963)

Эта среда подходит для выращивания многих водорослей, особенно хлорококковых, вольвоксовых (особенно родов *Chlamydomonas*), нитчатой зеленой водоросли *Klebsormidium flaccidum* (Kützinger) S.Mattox et Blackwell (Floyd et al., 1972), желтозеленой водоросли *Heterococcus endolithicus* Darling et Friedmann (Darling et al., 1987), эвгленовой водоросли *Colacium vesiculosum* Her. (Rosowski, Kurgens, 1973) и цианобактерии *Microsystis aeruginosa* Kützinger (Cole, Wynne, 1974).

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество (мл) | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--|---|------------------------------|---|
| Макроэлементы | | | |
| NaNO ₃ | 25 | 10 | $2,94 \times 10^{-3}$ |
| CaCl ₂ ×2H ₂ O | 2,5 | 10 | $1,70 \times 10^{-4}$ |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 7,5 | 10 | $3,04 \times 10^{-4}$ |
| K ₂ HPO ₄ | 7,5 | 10 | $4,31 \times 10^{-4}$ |
| KH ₂ PO ₄ | 17,5 | 10 | $1,29 \times 10^{-4}$ |
| NaCl | 2,5 | 10 | $4,28 \times 10^{-4}$ |
| Щелочной раствор ЭДТА | | 1 | |
| ЭДТА | 50 | | $1,71 \times 10^{-4}$ |
| КОН | 31 | | $5,53 \times 10^{-4}$ |
| Кислый раствор железа | | 1 | |
| FeSO ₄ | 4,98 | | $1,79 \times 10^{-5}$ |
| H ₂ SO ₄ | | 1 | |
| Раствор Бора | | 1 | |
| H ₃ BO ₃ | 11,42 | | $1,85 \times 10^{-4}$ |
| Раствор микроэлементов | | 1 | |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | 8,82 | | $3,07 \times 10^{-5}$ |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | 1,44 | | $7,28 \times 10^{-6}$ |
| MoO ₃ | 0,71 | | $4,93 \times 10^{-6}$ |
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 1,57 | | $6,29 \times 10^{-6}$ |
| Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O | 0,49 | | $1,68 \times 10^{-6}$ |

В 936 мл дистиллированной воды необходимо добавить по 10 мл раствора каждого из 6 макроэлементов и по 1мл каждого раствора микроэлементов, затем автоклавировать. pH конечного раствора - 6,6.

Существует несколько модификаций основной среды Болда:

КВВМ (BBM +0,25% суркозы +1,0% протеазного пептона) для культивирования штаммов, подобных хлорелле, живущих симбиотически с *Paramecium bursaria* Focke (Schuster et al., 1990).

BBM+GA (BBM+1% глюкоза +0,01М раствор гидролизатов аминокислот (например, гидролизат казеина) или 0,01М раствор аминокислот (например, пролина, глутамина или аргинина). Эта среда была разработана для культивирования симбионта лишайников *Trebouxia* (Fox, 1976).

3NBBM (BBM с утроенной концентрацией нитрата) для выращивания *Anabaena flos-aquae* Brébisson ex Bornet et Flahault и *Anacystis nidulans* Gardner (Thomas, Montes, 1978).

3NBBM+ раствор витаминов (BBM с утроенной концентрацией нитрата и добавлением трех витаминов) для выращивания *Batrachospermum* (Aghajanian, 1979). Витамины: добавьте 0,125 мкг/л витамина В₁ ($4,52 \times 10^{-10}$ М в конечном растворе); 0,125мкг/л биотина ($5,12 \times 10^{-10}$ М в конечном растворе); 0,125мкг/л цианокобаламина ($5,12 \times 10^{-10}$ М в конечном растворе).

Двойная усиленная среда BBM+стерилизованные зерна пшеницы. Эта среда предназначена для культивирования криптоноад *Chilomonas paramecium* Ehr. и *Cyathomonas truncata* (Fres.) (Kugrens et al., 1987).

Среда AF6 (Kato, 1982; Watanabe et al., 2000)

Среда была предложена в 1982 (Kato, 1982) для выращивания *Colacium* (Euglenophyceae), но затем стала широко применяться для выращивания водорослей, предпочитающих слегка кислую среду. Среда была модифицирована М.Ватанабе с соавторами в 2000 году (Watanabe et al., 2000), которые предложили использовать MES буфер и раствор микроэлементов. Среда AF6 используется для выращивания вольвоксовых (*Carteria*, *Gonium*, *Pandorina*, *Platydorina*, *Pleudorina*, *Pteromonas*, *Pseudocarteria*, *Volvox*), ксантофитовых (*Botrydiopsis arhiza* Borzi, *Botridium granulatum* (L.) Greville), многих криптофитов, динофлагеллят (*Peridinium*) и эвгленовых (*Phacus*, *Euglena*).

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--|---|-------------------------|---|
| MES буфер | - | 400мг | $2,05 \times 10^{-3}$ |
| Цитрат железа | 2 | 1мл | $8,17 \times 10^{-6}$ |
| Лимонная кислота | 2 | 1мл | $1,04 \times 10^{-5}$ |
| NaNO ₃ | 140 | 1мл | $1,65 \times 10^{-3}$ |
| NH ₄ NO ₃ | 22 | 1мл | $2,75 \times 10^{-4}$ |
| Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O | 49,4 | 1мл | $1,70 \times 10^{-7}$ |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 30 | 1мл | $1,22 \times 10^{-4}$ |
| KH ₂ PO ₄ | 10 | 1мл | $7,35 \times 10^{-5}$ |
| K ₂ HPO ₄ | 5 | 1мл | $2,87 \times 10^{-5}$ |
| CaCl ₂ ×2H ₂ O | 10 | 1мл | $6,8 \times 10^{-5}$ |
| Раствор микроэлементов (смотри ниже) | | 1мл | |
| Раствор витаминов (смотри ниже) | | 1мл | |

Приготовьте маточные растворы. В 950 мл дистиллированной воды растворите сначала MES буфер, цитрат железа и лимонную кислоту, затем добавьте другие растворы, доведя конечный объем до 1л. pH раствора - 6,6. Автоклавируйте.

Раствор микроэлементов для среды AF6

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Na ₂ ЭДТА× 2H ₂ O | - | 5г | $1,34 \times 10^{-5}$ |
| FeCl ₃ 2×6H ₂ O | - | 0,98г | $3,63 \times 10^{-6}$ |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | - | 0,18г | $9,10 \times 10^{-7}$ |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | - | 0,11г | $3,83 \times 10^{-7}$ |
| CoCl ₂ 6×6H ₂ O | 20 | 1мл | $8,41 \times 10^{-8}$ |
| Na ₂ MoO ₄ | 12,5 | 1мл | $5,17 \times 10^{-8}$ |

Приготовьте первоначальные маточные растворы. В 950 мл дистиллированной воды растворите ЭДТА, потом каждую соль, и затем добавьте по 1мл каждого маточного раствора.

Раствор витаминов для среды AF6

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Тиамин×HCl (витамин B ₁) | - | 10мг | $2,96 \times 10^{-8}$ |
| Биотин (витамин H) | 2 | 1мл | $8,19 \times 10^{-8}$ |
| Пиридоксин×HCl (витамин B ₆) | 1 | 1мл | $5,91 \times 10^{-9}$ |
| Цианокобаламин (витамин B ₁₂) | 1 | 1мл | $7,38 \times 10^{-10}$ |

Приготовьте маточные растворы. В 950 мл дистиллированной воды растворите раствор тиамина, и потом добавьте по 1 мл 2 маточных растворов. Простерилизуйте с помощью фильтрации. Храните в холодильнике (Andersen et al., 2005).

Среда для культивирования диатомовых водорослей (Cohn, Pickett-Heaps, 1988)

Среда разработана для выращивания пресноводной диатомовой водоросли *Suriella*, однако ее можно использовать для выращивания и других видов диатомей. Ее используют для выращивания *Navicula cuspidata* Kütz., *Nitzschia*, *Pinullaria*, *Stauroneis*.

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 70,85 | 1 мл | 3×10^{-4} |
| K_2HPO_4 | 54,44 | 1 мл | 4×10^{-4} |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 24,65 | 1 мл | 1×10^{-4} |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 20 мл, pH 8,5 | 1 мл | $\sim 3 \times 10^{-4}$ |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,278 | 1 мл | 1×10^{-6} |
| $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,02 | 1 мл | 1×10^{-7} |
| Почвенная вытяжка | - | 50 мл | - |
| Раствор витаминов | - | 1 мл | - |

В 900 мл дистиллированной воды растворите все компоненты. Доведите конечный объем до 1 л. Стерилизуйте методом тиндализации. Охладите и затем добавьте витамины и NaHCO_3 . Доведите pH раствора до 6,75. Стерилизуйте с помощью фильтра.

Раствор витаминов для культивирования диатомовых водорослей

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Тиамин $\times\text{HCl}$ (витамин B_1) | - | 1 г | $2,97 \times 10^{-6}$ |
| Биотин (витамин Н) | - | 1 г | $4,09 \times 10^{-6}$ |
| Никотиновая кислота (ниацин) | - | 1 г | $8,12 \times 10^{-6}$ |
| Цианокобаламин (витамин B_{12}) | 1 | 1 мл | $7,38 \times 10^{-10}$ |

В 950 мл дистиллированной воды растворите витамин B_1 и затем добавьте по 1 мл каждого маточного раствора. Доведите конечный объем до 1 литра. Стерилизуйте с помощью фильтра и храните в холодильнике (Andersen et al., 2005).

Среда BG-11 для синезеленых водорослей, модифицированная (Allen, 1968; Allen, Stainer, 1968; Rippka et al., 1979)

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Раствор цитрата железа | | 1 мл | |
| Лимонная кислота | 6 | 1 мл | $3,12 \times 10^{-5}$ |
| Цитрат аммоната железа | 6 | 1 мл | $\sim 3 \times 10^{-5}$ |
| NaNO_3 | - | 1,5 г | $1,76 \times 10^{-2}$ |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ | 40 | 1 мл | $1,75 \times 10^{-4}$ |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 75 | 1 мл | $3,04 \times 10^{-4}$ |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 36 | 1 мл | $2,45 \times 10^{-4}$ |
| Na_2CO_3 | 20 | 1 мл | $1,89 \times 10^{-4}$ |
| $\text{MgNa}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 1 | 1 мл | $2,79 \times 10^{-6}$ |
| Раствор микроэлементов | 1 мл | | |

Приготовьте маточный раствор цитрата железа (растворите цитрат железа в 1л дистиллированной воды) и другие маточные растворы. К 900 мл дистиллированной воды добавьте 1мл раствора цитрата железа, потом добавьте остальные компоненты. Автоклавируйте. pH финального раствора - 7,4.

Раствор микроэлементов для среды BG-11 (раствор микроэлементов A5+Co)

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--|---|-------------------------|---|
| H ₃ BO ₃ | - | 2,86г | $4,63 \times 10^{-5}$ |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | - | 1,81г | $9,15 \times 10^{-6}$ |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | - | 0,22г | $7,65 \times 10^{-7}$ |
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 79 | 1мл | $3,16 \times 10^{-7}$ |
| Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O | - | 0,391г | $1,61 \times 10^{-6}$ |
| Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O | 49,4 | 1мл | $1,70 \times 10^{-7}$ |

К 950 мл дистиллированной воды добавьте ЭДТА и другие компоненты, доведя финальный объем до 1 литра (Andersen et al., 2005).

Среда Чу-10 (Chu, 1942)

Среда Чу-10 является наиболее популярной из 17 питательных сред, предложенных С.Чу (Chu, 1942). Она представляет собой синтетическую среду, повторяющую по своему составу озерную воду, однако она лишена хелаторов, витаминов и микроэлементов (исключая железо). Она широко используется для культивирования водорослей, включая зеленые водоросли, диатомеи и цианобактерии (Chu, 1942). Многие синтетические среды были разработаны на основе среды Чу-10.

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--------------------------------------|---|-------------------------|---|
| Ca(NO ₃) ₂ | 40 | 1мл | $2,44 \times 10^{-4}$ |
| K ₂ HPO ₄ | 5 | 1мл | $2,87 \times 10^{-5}$ |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 25 | 1мл | $1,01 \times 10^{-4}$ |
| Na ₂ CO ₃ | 20 | 1мл | $1,89 \times 10^{-4}$ |
| Na ₂ SiO ₃ | 25 | 1 мл | $2,05 \times 10^{-4}$ |
| FeCl ₃ | 0,8 | 1мл | $4,93 \times 10^{-6}$ |

В 950 мл дистиллированной воды растворите каждый компонент. Доведите конечный объем до 1л и автоклавируйте.

Среда Чу-10 + 0,1мг/л витамина B₁₂ используется для выращивания *Cyclotella meneghiniana* Kützing и *C.cryptica* Reimann (Schultz, Trainor, 1968).

Среда WC (Guillard, Lorenzen, 1972)

Эта среда представляет собой модификацию среды Чу-10 и среды Райта для выращивания криптофитов (WC=Wright's cryptophyte). Среда WC без добавления буфера используется для выращивания желтозеленых водорослей *Tribonema aequale* Pascher, *Botridium becherianum* Vischer, *Vaucheria sessilis* (Vaucher) De Candolle, *Ophiocytium maius* Nägeli и эустигматофитовой водоросли *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd. Среда также применяется для культивирования хлорококковых и вольвоксовых (*Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*), десмидиевых (*Spondylosium*, *Cosmarium*, *Staurostrum*), диатомовых (*Asterionella*, *Cyclotella*, *Sellaphora*, *Stephanodiscus*) и цианобактерии *Microcystis* (Andersen et al., 2005).

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|--------------------------------------|
| Буфер (использовать только один буфер!) | | | |
| Глициглицин | - | 500мг | $3,78 \times 10^{-3}$ |
| Трис | - | 500мг | $4,13 \times 10^{-3}$ |
| NaNO ₃ | 85,01 | 1мл | $1,00 \times 10^{-3}$ |
| CaCl ₂ ×2H ₂ O | 36,76 | 1мл | $2,50 \times 10^{-4}$ |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 36,97 | 1мл | $1,50 \times 10^{-4}$ |
| NaHCO ₃ | 12,60 | 1мл | $1,50 \times 10^{-4}$ |
| Na ₂ SiO ₃ ×9H ₂ O | 28,42 | 1мл | $1,00 \times 10^{-4}$ |
| K ₂ HPO ₄ | 8,71 | 1мл | $5,00 \times 10^{-5}$ |
| Раствор микроэлементов | | 1мл | |
| Раствор витаминов | | 1мл | |

В 900мл дистиллированной воды растворите один из буферов. Добавьте остальные компоненты и доведите конечный объем до 1 л. pH конечного раствора - 7,6-8,0. Автоклавируйте.

Раствор микроэлементов для среды WC

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|--|-------------------------|--------------------------------------|
| Na ₂ ЭДТА× 2H ₂ O | - | 4,36г | $1,17 \times 10^{-5}$ |
| FeCl ₃ ×6H ₂ O | - | 3,15г | $1,17 \times 10^{-5}$ |
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 10,0 | 1мл | $4,01 \times 10^{-8}$ |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | 22,0 | 1мл | $7,65 \times 10^{-8}$ |
| CoCl ₃ ×6H ₂ O | 10,0 | 1мл | $4,20 \times 10^{-8}$ |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | 180,0 | 1мл | $9,10 \times 10^{-7}$ |
| Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O | 6,0 | 1мл | $2,48 \times 10^{-8}$ |
| H ₃ BO ₃ | - | 1г | $1,62 \times 10^{-5}$ |

К 950 мл дистиллированной воды добавьте все необходимые компоненты, доведите конечный объем до 1 л. Автоклавируйте.

Раствор витаминов для среды WC

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Тиамин×HCl (витамин B ₁) | - | 100мг | $2,96 \times 10^{-7}$ |
| Биотин (витамин H) | 0,5 | 1мл | $2,05 \times 10^{-9}$ |
| Цианокобаламин (витамин B ₁₂) | 0,5 | 1мл | $3,69 \times 10^{-10}$ |

В 950 мл дистиллированной воды растворите витамин B₁, добавьте 1 мл маточного раствора и доведите конечный объем до 1 литра. Стерилизуйте с помощью фильтрации и храните в холодильнике (Andersen et al., 2005).

Среда Фраквила (Fraquil medium) (Morel et al., 1975)

Эта среда была предложена для изучения взаимодействия микроэлементов с пресноводным фитопланктоном. Основные соли в этой среде те же, что и в среде WC, однако концентрации нитрата, фосфата и силиката уменьшены. Эта среда используется для изучения эффекта внесения металлов на рост, доступность питательных веществ, фотосинтетическую активность и морфологию *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson (Rueter, Ades, 1987), *Anabaena* (Rueter, 1988), *Asterionella ralfsii* var. *americana* Körner (Genesemer, 1990), *Selenastrum capricornutum* Printz (Errécalde, Campbell, 2000).

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| CaCl ₂ ×2H ₂ O | 36,80 | 1мл | $2,50 \times 10^{-4}$ |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 37,00 | 1мл | $1,50 \times 10^{-4}$ |
| NaHCO ₃ | 12,60 | 1мл | $1,50 \times 10^{-4}$ |
| Na ₂ SiO ₃ ×9H ₂ O | 3,55 | 1мл | $1,25 \times 10^{-5}$ |
| NaNO ₃ | 8,50 | 1мл | $1,00 \times 10^{-4}$ |
| K ₂ HPO ₄ | 1,74 | 1мл | $1,00 \times 10^{-5}$ |
| Раствор витаминов | | 0,5мл | - |
| Раствор микроэлементов | | 1мл | - |

К 900 мл дистиллированной воды добавьте по 1мл раствора каждой соли, 0,5 мл раствора витаминов и 1мл раствора микроэлементов. Доведите конечный объем до 1л.

Раствор витаминов для среды Фраквила

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Тиамин×HCl (витамин B ₁) | - | 200мг | $2,96 \times 10^{-7}$ |
| Биотин (витамин H) | 1,0 | 1мл | $2,05 \times 10^{-9}$ |
| Цианокобаламин (витамин B ₁₂) | 1,1 | 1мл | $4,06 \times 10^{-10}$ |

К 950 мл дистиллированной воды добавьте витамин B₁ и по 1мл каждого маточного раствора. Доведите конечный раствор до 1л. Стерилизуйте с помощью фильтрации. Храните в холодильнике.

Раствор микроэлементов для среды Фраквила

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--|---|-------------------------|---|
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 0,249 | 1мл | $9,97 \times 10^{-10}$ |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O | 0,265 | 1мл | $2,14 \times 10^{-10}$ |
| CoCl ₃ ×6H ₂ O | 0,595 | 1мл | $2,50 \times 10^{-9}$ |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | 4,550 | 1мл | $2,30 \times 10^{-8}$ |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | 1,150 | 1мл | $4,00 \times 10^{-9}$ |
| Na ₂ ЭДТА× 2H ₂ O | - | 1,860г | $5,00 \times 10^{-6}$ |
| FeCl ₃ ×6H ₂ O | - | 0,122г | $4,51 \times 10^{-7}$ |

К 950 мл дистиллированной воды добавьте по 1мл каждого маточного раствора. Важно добавить Na₂ЭДТА перед FeCl₃ для предотвращения осаждения гидроксида железа. Доведите конечный объем до 1л (Andersen et al., 2005).

Среда С (модифицированная) (Ichimura, 1971; Watanabe et al., 2000)

Эта среда была разработана для культивирования видов *Closterium* (отсюда С среда) и представляет собой модификацию среды для *Volvox* (Provasoli, Pintner, 1960) для выращивания десмидиевых водорослей. Эта среда хорошо подходит для культивирования хлорококковых водорослей, некоторых вольвоксовых (например, *Chlamydomonas*, *Carteria*, *Chloromonas*, *Hafniomonas*, *Haemotococcus*), десмидиевых (*Cosmarium*, *Cylindrocystis*, *Gonatozygon*, *Mesotaenium*), некоторых нитчатых зеленых водорослей (например, *Ulothrix*, *Uronema*, *Draparnaldia*, *Hyalotheca*, *Hydrodictyon*, *Stigeoclonium*) (Watanabe et al., 2000). Ниже перечислены несколько вариантов модификаций этой среды.

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--|---|-------------------------|---|
| Трис-буфер | - | 0,50г | $4,13 \times 10^{-3}$ |
| KNO ₃ | - | 0,10г | $9,89 \times 10^{-4}$ |
| Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O | - | 0,15г | $6,35 \times 10^{-4}$ |
| Na ₂ β-глицерофосфат×5H ₂ O | 50 | 1мл | $1,63 \times 10^{-4}$ |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 40 | 1мл | $1,62 \times 10^{-4}$ |
| K ₂ HPO ₄ | 1,74 | 1мл | $1,00 \times 10^{-5}$ |
| Раствор микроэлементов | | 3мл | - |
| Раствор витаминов | | 1мл | - |

К 900 мл дистиллированной воды добавьте трис-буфер, затем оставшиеся компоненты. Доведите объем раствора до 1л и автоклавируйте. pH конечного раствора - 7,5.

Модифицированный раствор микроэлементов для среды С (Provasoli, Pintner, 1960; Watanabe et al., 2000)

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|--|---|-------------------------|---|
| Na ₂ ЭДТА× 2H ₂ O | - | 1,000г | $8,06 \times 10^{-6}$ |
| FeCl ₃ ×6H ₂ O | - | 0,194г | $2,15 \times 10^{-6}$ |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | 36,00 | 1мл | $5,46 \times 10^{-7}$ |
| ZnCl ₂ | 10,44 | 1мл | $2,30 \times 10^{-7}$ |
| Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O | 12,62 | 1мл | $1,56 \times 10^{-7}$ |
| CoCl ₃ ×6H ₂ O | 4,04 | 1мл | $5,09 \times 10^{-8}$ |

К 950 мл дистиллированной воды добавьте ЭДТА и потом растворите каждую из солей. Доведите объем раствора до 1л.

Раствор витаминов для среды С

| Компонент | Маточный раствор (г/л дистиллированной воды) | Используемое количество | Концентрация в конечной среде (моль) |
|---|---|-------------------------|---|
| Тиамин×HCl (витамин B ₁) | - | 10мг | $2,97 \times 10^{-8}$ |
| Биотин (витамин H) | 0,1 | 1мл | $4,09 \times 10^{-10}$ |
| Цианокобаламин (витамин B ₁₂) | 0,1 | 1мл | $7,38 \times 10^{-11}$ |

В 950 мл дистиллированной воды растворите витамин B₁ и затем добавьте по 1мл каждого маточного раствора. Доведите объем раствора до 1л. Стерилизуйте с помощью фильтрации и храните в замороженном состоянии (Andersen et al., 2005).

Среда СВ (среда С с pH=9,0 с использованием бицина вместо трис-буфера). Используется для культивирования видов *Microcystis* (Watanabe et al., 2000).

Среда Csi (среда С с pH=7,0 с использованием 500мг HEPES вместо трис-буфера+100мг/л Na_2SiO_3 с концентрацией в конечном растворе $3,52 \times 10^{-4}$ М). Эта среда предназначена для выращивания диатомовых водорослей (Otsuki et al., 1987; Watanabe et al., 1987; Soma et al., 1993) и различных видов бентосных водорослей (Takamura et al., 1988, 1989).

Среда СТ (среда С с pH=8,2 с использованием 400мг TAPS-буфера). Среда применяется для выращивания штаммов *Anabaena* (Li et al., 1998) и осцилляториевых цианобактерий (Suda et al., 2002).

Среда СУТ (1 литр среды С+1г дрожжей+2г триптона). Эта среда способствует хорошему росту бесцветной криптомонады *Chilomonas paramecium* Ehr. (Erata, Chihara, 1987).

Среда для проведения теста на загрязненность (Watanabe et al., 2000)

Тестовая среда В-I: 1г протеазного пептона

Тестовая среда В-II: 5г экстракта дрожжей

Тестовая среда В-III: 5г пептона+ 3г мясного экстракта

Тестовая среда В-IV: 1г глюкозы+ 1г пептона

Тестовая среда В-V: 0,5 ацетата натрия+ 0,5г глюкозы +0,5г триптона +0,3г экстракта дрожжей

Тестовая среда УТ: 1г дрожжей+2г триптона

Эти среды готовятся путем добавления органических компонентов к 1литру питательной среды для водорослей (которая будет использоваться для выращивания водорослей). Для олиготрофных бактерий нужно существенно уменьшать концентрации органических компонентов. В жидкую питательную среду необходимо добавить органические вещества, в бульон добавить агар (10-15г агара на 1 л бульона), нагреть до растворения агара. После растворения агара раствор автоклавировать и разлить в чашки Петри (Andersen et al., 2005).

Среда Кнопа

(г/л, применяется в разведениях $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{10}$, для зеленых водорослей):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 0,25$

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,06$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,06$

$\text{KCl} - 0,08$

$\text{Fe}_2\text{Cl}_6 - \text{одна капля } 1\% \text{ раствора}$

Среда Прата

(г/л, для хранения коллекции культур):

$\text{KNO}_3 - 0,10$
 $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,01$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$
Агар-агар – 1,2%
 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,001$

Среда Тамия

(г/л, применяется в различных разведениях для зеленых водорослей):

$\text{KNO}_3 - 5,0$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 2,50$
 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,25$
 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,003$
Раствор микроэлементов – 1 мл, ЭДТА – 0,037
Раствор микроэлементов (г/л): $\text{H}_3\text{BO}_3 - 2,86$; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O} - 1,81$;
 $\text{ZnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O} - 0,222$; $\text{MoO}_3 - 176,4$ мг/10л; $\text{NH}_4\text{VO}_3 - 229,6$ мг/10л

Среда Громова

(мг/л, универсальная среда, применяемая в разных разведениях):

| | |
|--|--|
| $\text{KNO}_3 - 100$ | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O} - 1$ |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 66,7$ | $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 9,3$ |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 33,3$ | $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 1,2$ |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,022$ | $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O} - 0,02$ |
| $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 1,81$ | ЭДТА – 10 |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0,079$ | Агар-агар – 1,5% |
| $\text{Na}_3\text{BO}_3 \times 4\text{H}_2\text{O} - 2,63$ | |

Среда Гиндака

(г/л, применяется в разведениях $\frac{1}{4}$ и $\frac{1}{8}$
для интенсивного культивирования водорослей):

| | |
|---|--|
| $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 - 3,0$ | $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,025$ |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,3$ | $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,006$ |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 5,0$ | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,005$ |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2,5$ | $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0,008$ |
| $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,06$ | $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,002$ |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,04$ | ЭДТА – 0,37 |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,04$ | |

Среда Шенборна
(г/л, для *Euglena viridis*):

$\text{NH}_4\text{NO}_3 - 1,0$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,2$
 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,2$
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,1$
 $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O} - 0,0001$
 $\text{Fe}_2\text{Cl}_6 \times \text{H}_2\text{O} - 0,0025$

Среда Бристоль в модификации Голлербаха
(г/л, для почвенных водорослей):

$\text{NaNO}_3 - 0,25$
 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,25$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,15$
 $\text{CaCl}_2 - 0,05$
 $\text{NaCl} - 0,05$
 $\text{Fe}_2\text{Cl}_6 - \text{следы}$ (3 капли 1%-го раствора)

Среда Артари
(г/л, для гипергалобных водорослей):

$\text{NaCl} - 116,0$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 50,0$
 $\text{KNO}_3 - 2,5$
 $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,2$
 $\text{NaHCO}_3 - 1,0$
Железо-аммиачные квасцы – следы
Относительная плотность среды – 1,1; pH 6 – 7
Эту среду, разбавленную до относительной плотности 1,02, можно использовать для выращивания солоноватоводных и морских водорослей.

Среда Дрю
(г/100мл, для азотфиксирующих синезеленых водорослей):

$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,02$
 $\text{MgSO}_4 - 0,02$
 $\text{CaCl}_2 - \text{следы}$
 $\text{FeCl}_3 - \text{следы}$
Вода дистиллированная – 100мл.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Автотрофные организмы – организмы, использующие для построения своего тела углекислый газ в качестве единственного или главного источника углерода и обладающие как системой ферментов для ассимиляции углекислого газа, так и способностью синтезировать все компоненты клетки.

Агар – гелеобразная фракция клеточных стенок некоторых красных водорослей, состоящая из комплекса полисахаридов (в основном из β -1,3-связанной D-галактозы и 1,4-связанной дегидро-L-галактозы). Используется для приготовления гелеобразных питательных среда для выращивания водорослей и бактерий.

Аксеничная культура – культура одного вида водорослей, свободная от всех загрязнителей, включая вирусы.

Альгологически чистая культура - культура, содержащая только одну систематическую форму водорослей, но не очищенная от бактерий и грибов. Образец культуры - совокупность индивидов, выращиваемых в одной склянке.

Антибиотики – специфические химические вещества, образуемые микроорганизмами и способные в малых количествах оказывать избирательное токсическое действие на другие микроорганизмы и на клетки злокачественных опухолей.

Аэрофильные водоросли – «воздушные» водоросли, получающие все необходимые вещества из атмосферы. Обычно обитают на коре деревьев, скалах, камнях.

Бактерии – микроорганизмы с прокариотным типом строения клетки. Традиционно под собственно бактериями подразумевают одноклеточные или объединенные в организованные колонии палочки и кокки, неподвижные или со жгутиками, противопоставляя их морфологически более сложным прокариотам – актиномицетам, цианобактериям, спирохетам, микособактериям, почкующимся бактериям, риккетсиям.

Бентос – совокупность организмов, обитающих на грунте и в грунте морских и континентальных водоемов. Бентос делят на растительный (фитобентос) и животный (зообентос).

Бурые водоросли (Phaeophyta) – отдел водорослей. Многоклеточные, преимущественно макроскопические водоросли длиной до 60м. Слоевища желтовато-бурые из-за большого количества фукоксантина и других ксантофилловых пигментов, содержат хлорофиллы а и с. В клеточных стенках – альгиновая кислота и фукоидин. Цитоплазма включает физоиды – пузырьки с дубильными веществами. Запасные вещества – ламинарин и маннитол, реже масло. Для бурых водорослей характерны: многоклеточ-

ные волоски с базальной зоной роста; многогнездные вместилища, функционирующие как гаметангии или спорангии; зооспоры и гаметы с двумя жгутиками, прикрепленными сбоку. Половой процесс – изо-, анизо- или оогамия. Цикл развития изоморфный (более древний) или гетероморфный. Растут во всех морях, в холодных водах образуют густые заросли.

Виды – это группы скрещивающихся естественных популяций, репродуктивно изолированных от других групп.

Вирус – облигатный паразит неклеточной природы, состоящий из протеиновой оболочки и имеющий размер от 20 до 400 нм.

Гамета – гаплоидная стадия размножения.

Гаметофит – половое поколение в жизненном цикле растений, развивающихся с чередованием поколений. Гаметофит образуется из споры, имеет гаплоидный набор хромосом.

Гаплоид – клетка с одним набором хромосом: одна копия основных генетических признаков видов.

Гетеротрофные организмы – организмы, использующие в качестве источника углерода готовые органические вещества. К ним относятся все животные, грибы, большинство бактерий, а также бесхлорофилльные наземные растения и водоросли.

Гетероциста – клетка синезеленых водорослей, отличающаяся от нормальных вегетативных клеток благодаря утолщенным клеточным стенкам и желтоватой окраске, участвует в азотфиксации.

Грибы – низшие эукариоты, одно из царств живых организмов. Своеобразие грибов определяется сочетанием признаков как растений (неподвижность, неограниченный верхушечный рост, способность к синтезу витаминов, наличие клеточных стенок), так и животных (гетеротрофный тип питания, наличие хитина в клеточных стенках, запасных углеводов в форме гликогена, образование мочевины, структура цитохрома), а также особым циклом развития (смена ядерных фаз, наличие дикарионов, гетерокариоза, парасексуального процесса).

Дезинфекция – процесс или процедура, уничтожающая или уменьшающая число патогенных микроорганизмов.

Диатомовые водоросли, диатомеи (Bacillariophyta) – кремнистые водоросли, отдел водорослей. Одноклеточные, микроскопические (от 4 до 2000 мкм), одиночные или колониальные организмы. Характерная особенность – наличие твердой двустворчатой кремнеземной оболочки – панциря. Хлоропласты содержат хлорофиллы а и b и фукоксантин, придающий диатомеям бурый цвет. Запасные вещества – масло, волютин и хризоламин. Размножаются делением и половым путем (изогамия безжгутиковых гамет, конъюгация, автогамия или оогамия). Широко распространены в континентальных водоемах, морях, почве. Диатомовые водоросли – важнейшие продуценты органического вещества, они создают около 25% мировой первичной продукции, создаваемой растениями.

Динофитовые водоросли (Dinophyta) – отдел водорослей. Объединяет представителей нескольких морфологических типов, из которых доминирует монадный – одноклеточные двухжгутиковые организмы (часто называемые динофлагеллятами). Расположенный вдоль продольной оси клетки жгутик сообщает ей поступательное движение, второй, перпендикулярный первому, – вращательное движение. Хлоропласты бурые, содержат хлорофиллы а и с, а также ксантофилл. Некоторые представители динофитовых водорослей могут питаться гетеротрофно. Есть бесцветные формы; некоторые паразитируют на водных организмах.

Динофлагелляты – монадные формы динофитовых водорослей.

Диплоид – клетка с двумя наборами хромосом: две копии основных генетических признаков видов.

Дрожжи – сборная группа грибов, не имеющих типичного мицелия и существующая в виде отдельных почкующихся или делящихся клеток и их колоний.

Желатин – студнеобразующее вещество, продукт денатурации коллагена. Получают вывариванием костей, хрящей, сухожилий.

Желтозеленые водоросли (Xanthophyta) – отдел водорослей. Морфологически разнообразная группа – одно- и многоклеточные, прикрепленные и свободноплавающие, монадные, амeboидные, коккоидные, нитчатые, пластинчатые, сифональные организмы. Комбинация содержащихся в желтозеленых водорослях пигментов (хлорофиллы а и с, α- и β-каротины, ксантофиллы) определяют их окраску – светло- или темно-желтую, реже зеленую и голубую. Вегетативное размножение – делением, бесполое – зоо- и апланоспорами (у некоторых половой процесс – изогамия). Желтозеленые водоросли – представители планктона, реже в морях, поселяются также на влажной почве.

Зеленые водоросли (Chlorophyta) – отдел водорослей, объединяющий одноклеточные, колониальные, многоклеточные (нитевидные и пластинчатые) и неклеточного строения (сифоновые водоросли). Подвижные формы с 2-4 жгутиками и светочувствительным глазком. Клетки большей частью с целлюлозной оболочкой. Сходны с высшими растениями: содержат те же пигменты (хлорофиллы а и b, каротины, ксантофиллы), запасное питательное вещество – крахмал, тот же состав ферментов, участвующих в фотосинтезе. Как и для высших растений, для зеленых водорослей характерно правильное чередование поколений – бесполого (размножение зоо- и апланоспорами, акинетами) и полового (изо-, анизо-, оогамии, конъюгация). В настоящее время обнаружено много признаков, доказывающих филогенетическое происхождение наземных растений от зеленых водорослей (по результатам электронно-микроскопических и молекулярно-генетических исследований). Распространены преимущественно в пресных водах, обитают и в морях. Некоторые представители обитают в почве, на скалах, коре деревьев, являются симбионтами лишайников и животных.

Зигота – клетка, образованная в результате слияния двух гамет или половых клеток.

Изогамия – морфологическое состояние, при котором женские и мужские гаметы имеют одинаковую морфологию.

Изогамный – способ размножения, при котором организм производит морфологически идентичные гаметы.

Изолят – совокупность особей одного вида, выделенных из одной или нескольких клеток.

Изоляция – процесс отбора одной или более клеток и выделение их в культуру, в идеале культура должна быть выделена из одной клетки без загрязнителей.

Инокулят – группа живых клеток или организмов, используемых для начала новой культуры водорослей после пересева в свежую питательную среду или для инициации новой популяции в природе.

Клональная культура – штамм культуры, выделенный из одиночной клетки, которая может размножаться с помощью гомоталломного полового процесса (гетерозиготные аллели изменяются в ходе мейоза, которые после этого перестают быть истинными клонами). Необходимо отметить, что не всегда возможно однозначно установить, размножается ли штамм половым путем. Поэтому предположение о половом размножении новых изолятов следует делать с большой осторожностью.

Кокки – бактерии шаровидной формы. Таксономического значения термин не имеет, так как описывает только форму микроорганизма.

Контаминант – организм, вызывающий загрязнение.

Красные водоросли, багрянки (Rhodophyta) – отдел водорослей. Слоевища многоклеточные, реже одноклеточные (у бангиевых), сложного морфологического и анатомического строения. Хлоропласты содержат хлорофиллы а и b, каротиноиды и специфические пигменты – фикобилины, различное сочетание которых определяет окраску красных водорослей – от ярко-красной до голубовато-зеленой и желтой. Запасное вещество – багрянковый крахмал, близок к амилопектину и гликогену. Жгутиковые стадии отсутствуют (характерное отличие от других групп водорослей). Размножение вегетативное, половое (оогамия) и бесполое. Женские половые органы – карпогоны – развиваются на концах карпогонных нитей, строение и характер образования которых – одни из главных систематических признаков. Спорофиты и гаметофиты сходного или разного строения. Обитают преимущественно в морях. На больших глубинах часто преобладают над другими группами водорослей.

Криопрезервация – процесс хранения живых организмов или их частей при ультранизкой температуре (обычно ниже -130°C) с сохранением способности самовосстановления после оттаивания.

Культура – совокупность всех водорослей, выделенных из одного источника и выращиваемых в одной или разных склянках.

Литические вирусы – вирусы, вызывающие разрушение клеток хозяина.

Лишайники (Lichens) – организмы, образованные симбиозом гриба (микобионт) и водоросли (фикобионт); традиционно относятся к низшим растениям.

Макроэлементы – химические элементы, содержащиеся в организме в высоких концентрациях. К ним относят углерод, азот, кислород, фосфор, кальций и калий.

Мейоз – деление клетки, в результате которого образуются дочерние клетки, каждая из которых содержит половину материнского набора хромосом.

Микроорганизмы – микробы, мельчайшие организмы, различимые только под микроскопом. Открыты в XVII веке А.Левенгуком. Среди микроорганизмов – представители разных царств органического мира, относящиеся к прокариотам (бактерии, к которым причисляют и синезеленые водоросли, архебактерии) и эукариотам (микроскопические грибы, водоросли, простейшие).

Микроэлементы – химические элементы, содержащиеся в организмах в низких концентрациях (обычно тысячные доли процента и ниже) и необходимые для их нормальной жизнедеятельности. Насчитывается свыше 30 микроэлементов – металлов (алюминий, железо, медь, марганец, цинк, молибден, кобальт, никель и другие) и неметаллов (йод, селен, бром, фтор, мышьяк, бор).

Миксобактерии – порядок граммотрицательных бактерий, обладающих скользящим движением и образующие плодовые тела и миксоспоры.

Миксотрофные микроорганизмы – организмы, способные сочетать одновременно различные типы питания (обмена веществ). Например, многие пурпурные бактерии используют углекислый газ по автотрофному типу и ассимилируют органические соединения; некоторые хемолитотрофные бактерии могут одновременно окислять органические и неорганические вещества.

Обогащенные культуры – природные образцы или вновь выделенные культуры с добавленными питательными веществами, обычно содержат несколько видов водорослей и загрязнителей.

Одновидовая культура – культура, которая содержит один вид водорослей, но может содержать различные фенотипы водорослей и загрязнителей (например, бактерий); обычно эта культура не содержит грибы.

Парафильм – прозрачная пленка, пропускающая воздух, но не пропускающая микроорганизмы. Используется для сохранения стерильности пробирок и чашек Петри.

Пастеризация – нагревание жидкости до температуры от 66 до 80°C, в течение по 30 минут с последующим быстрым охлаждением до температуры менее 10°C

Пептон – продукт гидролиза белков.

Пикопланктон – фракция планктона диаметром менее 2-3мкм. Первоначально этот термин использовался для обозначения планктона размером 0,2-2мкм; для обозначения более мелких вирусов используется понятие «фемтопланктон». Термин «ультрапланктон» обычно используется для обозначения планктона 0,2-5мкм.

Покой – период времени между образованием и прорастанием цисты.

Популяция – совокупность особей одного вида, обладающих общим генофондом и занимающих общую территорию.

Почвенные водоросли – совокупность нескольких экологических группировок водорослей, жизнь которых связана с почвой как средой обитания. Почвенные водоросли включают наземные водоросли, которые лишь при благоприятных условиях в массовых количествах разрастаются на поверхности почвы; водно-наземные, разрастающиеся на поверхности постоянно влажной почвы; собственно почвенные водоросли, населяющие толщу почвенного слоя.

Прокариоты – организмы, клетки которых не имеют ограниченного мембраной ядра – все бактерии, включая археобактерии и цианобактерии. Аналог ядра – структура, состоящая из ДНК, белков и РНК. Генетическая система прокариот (генофор) закреплена на клеточной мембране и соответствует примитивной мембране. При удвоении генофора две его копии расходятся, увлекаемые растущей клеточной мембраной. Митоз у прокариот отсутствует. Они лишены хлоропластов, митохондрий, аппарата Гольджи, центриолей, имеющих у эукариот. Рибосомы прокариот отличаются по числу белков и коэффициенту седиментации от цитоплазматических рибосом эукариот. Основной структурный компонент клеточной стенки у многих прокариот – гликопротеид муреин. Прокариоты способны осуществлять ряд специфических физиологических процессов, например, некоторые прокариоты способны фиксировать атмосферный азот. По строению клетки прокариоты противопоставляют эукариотам, к которым относят все остальные организмы. Различия между прокариотами и эукариотами так существенны, что в системе организмов их выделяют в надцарства.

Растущая циста – первоначально неподвижная гипнозигота с устойчивой внешней оболочкой.

Симбиоз – различные формы совместного существования разнотипных организмов, составляющих симбионтную систему.

Синезеленые водоросли (Cyanophyta, или Cyanomycota) – цианеи, отдел водорослей. По строению клеток, включая организацию ядерного аппарата, их составу и генетическим свойствам относятся к прокариотам. На этом основании их относят к бактериям и называют цианобактериями. Полагают также, что царство (надцарство) прокариот имеет две ветви Вас-

teria и Cyanophyta. Основанием служит наличие у Cyanophyta типичных водорослевых пигментов и более сложна по сравнению с бактериями структура. Одновременно Cyanophyta включаются в ботаническую классификацию, которая является филогенетической. Фотосинтезирующие организмы, содержат хлорофилл а, каротиноиды и особые пигменты фикобилиппротеиды, которые обнаружены еще только у красных водорослей и криптононад. Окраска сине-зеленая или розоватая. Одноклеточные и многоклеточные (нитчатые), микроскопические, но часто образуют крупные скопления в виде корок и кустиков высотой до 20см (в тропических морях). Размножаются делением (одноклеточные), спорами, акинетами и фрагментами нитей (гормогониями). Растут в самых разнообразных условиях в воде и на суше. У многих видов обнаружена способность к азотфиксации. Синезеленые водоросли являются пионерами жизни в крайних условиях существования (в горах, в Арктике и Антарктиде). Часто вступают в симбиотические отношения с другими микроорганизмами.

Спорофит – бесполое поколение растений, жизненный цикл которых проходит с ритмическим чередованием половой и бесполой фаз (поколений); продуцирует споры. Спорофит образуется после оплодотворения – слияния мужской и женской гаплоидных гамет в диплоидную зиготу, из которой развивается многоклеточный зародыш, дающий начало взрослому растению.

Стерилизация – процесс или процедура установления асептических условий, направленная на уменьшение числа или уничтожения всех микроорганизмов. Существует 4 основных вида стерилизации: нагревание, стерилизация электромагнитным излучением, фильтрация и химическая стерилизация.

Таксономия – раздел систематики, теория и практика классификации организмов. Термин предложен в 1813 году О.Декандолем. Иногда его употребляют как синоним систематики и классификации, однако обычно систематику понимают как науку о разнообразии организмов и взаимоотношении между ними, а таксономию – как раздел этой науки, посвященный принципам, методам и правилам классификации.

Тиндаллизация – подобна стерилизации, однако отличается повторяемостью процесса: нагревание жидкости обычно от 66 до 80°С, в течение 30 минут, с последующим быстрым охлаждением до температуры менее 10°С и хранение в охлажденном состоянии до следующего дня; эта процедура повторяется трижды.

Фототаксис – движение организмов по направлению к источнику света.

Хелат – прочный комплекс между органическим лигандом и металлом.

Хелатирование – реакция металла с органическим лигандом с образованием хелата.

Хелатор – органический лиганд, который образует устойчивый комплекс с ионами металла.

Хроническая инфекция – постоянное воспроизводство инфицирующего вируса в результате выживания инфицированного хозяина.

Циста – стадия размножения водорослей, покрытая оболочкой, устойчивой к условиям окружающей среды.

Штамм - это генетически однородная культура в пределах данного вида водорослей, обладающая специфическими отличительными признаками, однако не достигающими уровня таксономических различий.

Эвгленовые водоросли (Euglenophyta) – отдел водорослей. Оноклеточные микроскопические (длиной от 4 до 500 мкм) подвижные организмы, реже прикрепленные и колониальные. Не имеют настоящей оболочки; защитную роль выполняет наружный слой экзоплазмы – перипласт. Некоторые виды заключены в плотный «домик», пропитанный солями железа и марганца. На переднем конце клетки углубление (глотка), из которого выходят 1-2 жгутика. Имеются глазок и пульсирующие вакуоли. Хлоропласты содержат хлорофиллы а и b. Способны к миксотрофному питанию. Существуют бесцветные виды, питающиеся осмо- и фаготрофно. Запасное вещество – парамилон. Размножение делением. Некоторые представители при неблагоприятных условиях образуют цисты. Половой процесс достоверно неизвестен. Обитают в основном в небольших пресных, преимущественно эвтрофных водоемах, многие участвуют в самоочищении водоемов.

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, хелатор, используемый в буферных системах, содержащих ионы металлов.

Эппендорф – пластиковая пробирка с крышкой. Используется при проведении молекулярно-генетических исследований и транспортировки культур водорослей.

Эукариоты – организмы, клетки которых содержат оформленные ядра. К эукариотам относятся все высшие животные и растения, а также одноклеточные и многоклеточные водоросли, грибы и простейшие. Ядерная ДНК у эукариот заключена в хромосомах, обычно не кольцевидная, соединена с гистонами и, как правило, образует серию клубочков вокруг октомеров гистонов – нуклеосом. Эукариоты обладают ограниченными мембраной клеточными органоидами (иногда с собственной ДНК) – хлоропластами, митохондриями и др. В систематике эукариоты выделяют в надцарство Eucaryota и противопоставляют прокариотам.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| ПРЕДИСЛОВИЕ | 3 |
| ГЛАВА 1. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК О РАЗВИТИИ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ..... | 5 |
| 1.1. Культивирование водорослей в XIX веке..... | 5 |
| 1.2. Культивирование водорослей в XX веке | 8 |
| 1.2.1. Обычное культивирование водорослей | 8 |
| 1.2.2. Массовое культивирование микроводорослей | 16 |
| 1.2.3. Культивирование морских водорослей..... | 17 |
| 1.2.4. Криопрезервация | 18 |
| ГЛАВА 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВОДОРΟΣЛЕЙ..... | 19 |
| 2.1. Материалы..... | 19 |
| 2.1.1. Химикаты | 19 |
| 2.1.2. Оборудование | 19 |
| 2.1.3. Посуда | 19 |
| 2.1.4. Вода | 20 |
| 2.1.5. Агар..... | 21 |
| 2.1.6. Почва | 21 |
| 2.2. Маточные растворы | 22 |
| 2.2.1. Общие комментарии | 22 |
| 2.2.2. Макроэлементы | 23 |
| 2.2.3. Микроэлементы..... | 24 |
| 2.2.3.1. Приготовление отдельных растворов | 24 |
| 2.2.3.2. Смешанный маточный раствор (рабочий маточный раствор)..... | 24 |
| 2.2.4. Витамины | 25 |
| 2.2.4.1. Приготовление отдельных растворов витаминов | 25 |
| 2.2.4.2. Смешанный маточный раствор витаминов | 26 |
| 2.3. Общие методы приготовления питательных сред..... | 26 |
| 2.3.1. Синтетические среды..... | 27 |
| 2.3.2. Обогащенные среды..... | 27 |
| 2.3.3. Почвенная вытяжка..... | 28 |
| 2.3.4. Твердые питательные среды | 29 |
| 2.3.4.1. Стандартный питательный агар..... | 29 |
| 2.3.4.2. Питательные чашки с агаром | 30 |
| 2.4. Рецепты питательных сред | 30 |

ГЛАВА 3. МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ. 31

| | |
|---|-----------|
| 3.1. Устройство микроскопа..... | 31 |
| 3.1.1. Механическая часть микроскопа..... | 31 |
| 3.1.2. Оптическая часть микроскопа | 32 |
| 3.2. Основные технические характеристики микроскопа | 37 |
| 3.2.1. Увеличительная способность микроскопа | 37 |
| 3.2.2. Разрешающая способность микроскопа | 38 |
| 3.3. Работа с микроскопом | 38 |
| 3.3.1. Общие правила работы с микроскопом | 38 |
| 3.3.2. Установка освещения | 39 |
| 3.3.3. Настройка микроскопа для работы при малом увеличении | 39 |
| 3.3.4. Настройка микроскопа для работы при большом увеличении | 40 |
| 3.3.5. Работа с иммерсионной системой микроскопа | 41 |
| 3.4. Измерение объектов..... | 41 |

ГЛАВА 4. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ..... 43

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Общие представления о стерилизации | 43 |
| 4.2. Процедура предварительной стерилизации | 46 |
| 4.2.1. Стерилизация новой посуды | 46 |
| 4.2.2. Стерилизация грязной посуды | 46 |
| 4.2.3. Стерилизация стеклянных пипеток | 47 |
| 4.3. Стерилизация питательных сред..... | 48 |
| 4.3.1. Стерилизация маточных растворов | 48 |
| 4.3.2. Стерилизация жидких питательных сред | 48 |
| 4.3.3. Стерилизация агаровых питательных сред | 48 |
| 4.4. Способы стерилизации..... | 49 |
| 4.4.1. Автоклавирование | 49 |
| 4.4.2. Стерилизация сухим жаром | 51 |
| 4.4.3. Пастеризация и тиндаллизация..... | 52 |
| 4.4.4. Стерилизация фильтрацией..... | 53 |
| 4.4.5. Стерилизация с помощью микроволновой печи..... | 54 |
| 4.4.6. Стерилизация с помощью ультрафиолетового облучения | 55 |
| 4.4.7. Стерилизация с использованием отбеливателя | 55 |
| 4.4.8. Стерилизация с помощью оксида этилена | 56 |
| 4.5. Хранение стерилизованных материалов..... | 56 |
| 4.6. Процедуры пересева культур в стерильных условиях | 56 |
| 4.6.1. Стерильные комнаты | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.2.Пересадка жидких культур водорослей | 58 |
| 4.6.3.Пересадка агаровых культур..... | 64 |
| 4.7.Оценка стерильности | 66 |
| ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОДОРосЛЕЙ В КУЛЬТУРУ.. | 68 |
| 5.1.Общие понятия о методах выделения водорослей | 68 |
| 5.2.Факторы, влияющие на выделение водорослей..... | 68 |
| 5.3.Отбор образцов | 69 |
| 5.4.Оборудование и материалы | 70 |
| 5.4.1.Микроскопы..... | 70 |
| 5.4.2.Фильтры и сита..... | 72 |
| 5.4.3.Посуда | 73 |
| 5.4.4.Камеры для выращивания водорослей | 75 |
| 5.5.Среды, используемые при выделении водорослей | 75 |
| 5.6.Стандартные методы выделения водорослей | 76 |
| 5.6.1.Накопительные культуры..... | 76 |
| 5.6.2.Выделение клеток с помощью микропипетки | 78 |
| 5.6.3.Выделение клеток с использованием агара | 83 |
| 5.6.3.1.Посев штрихом | 83 |
| 5.6.3.2.Культивирование водорослей внутри агара | 84 |
| 5.6.3.3.Методика автоматизированного распыления..... | 85 |
| 5.6.3.4.Выделение водорослей методом перемещения через агар | 85 |
| 5.6.4.Метод разбавления..... | 85 |
| 5.6.5.Разделение водорослей центрифугированием и осаждением | 87 |
| 5.6.6.Выделение с использованием фитотаксиса..... | 88 |
| 5.7.Специальные методы выделения водорослей | 89 |
| 5.7.1.Выделение пикопланктона | 89 |
| 5.7.2.Выделение водорослей, прикрепленных к субстрату | 91 |
| 5.7.3.Выделение аэрофильных водорослей | 91 |
| 5.7.4.Выделение эпифитов после обработки ультразвуком..... | 92 |
| 5.7.5.Выделение водорослей, живущих в песке..... | 92 |
| 5.7.6.Выделение цист из осадков..... | 93 |
| 5.7.7.Выделение водорослей, обитающих в проточных водоемах | 94 |
| 5.7.8.Удаление диатомовых водорослей с помощью диоксида германия..... | 94 |
| 5.7.9.Удаление синезеленых водорослей с помощью антибиотиков..... | 95 |

| | |
|---|------------|
| ГЛАВА 6. МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ АЛЬГОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ..... | 96 |
| 6.1. Основные условия очистки культур..... | 96 |
| 6.2. Оборудование для культивирования и питательные среды | 99 |
| 6.3. Методы и техники очистки | 100 |
| 6.3.1. Очистка с использованием разницы в размере и фильтрация..... | 100 |
| 6.3.2. Дифференциальное центрифугирование | 101 |
| 6.3.3. Использование ультразвука и перемешивание | 101 |
| 6.3.4. Очистка путем разведения | 103 |
| 6.3.5. Агаровые чашки | 103 |
| 6.3.6. Очистка с помощью микропипеток..... | 104 |
| 6.3.7. Использование антибиотиков | 105 |
| 6.3.8. Очистка с помощью ультрафиолетового облучения | 106 |
| 6.3.9. Проверка загрязненности | 106 |
| ГЛАВА 7. ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР ВОДОРОСЛЕЙ | 107 |
| 7.1. Значение коллекций культур водорослей..... | 107 |
| 7.2. Организация функционирования коллекций культур | 108 |
| 7.2.1. Методики пересева..... | 108 |
| 7.2.2. Пересев агаризованной среды..... | 109 |
| 7.2.3. Пересев жидкой культуры..... | 109 |
| 7.2.4. Пересев нитчатых водорослей | 109 |
| 7.2.5. Условия культивирования | 110 |
| 7.2.6. Выбор среды культивирования..... | 110 |
| 7.2.7. Свет и температура | 111 |
| 7.2.8. Частота пересевов | 112 |
| 7.2.9. Определение оптимальных условий культивирования для новых изолятов..... | 113 |
| 7.2.10. Установки для культивирования | 113 |
| 7.2.11. Оборудование и условия, необходимые для постоянного культивирования | 113 |
| 7.2.12. Поддержание порядка в хранении культур | 116 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 117 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 128 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ | 140 |

Учебное издание

Л.А. ГАЙСИНА, А.И. ФАЗЛУТДИНОВА, Р.Р.КАБИРОВ

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ВОДОРОСЛЕЙ**

Редактор Т.В. Подкопаева

Технический редактор И.В. Пономарев

Лиц. на издат. деят. Б848421 от 03.11.2000 г. Подписано в печать 21.12.2008.

Формат 60X84/16. Компьютерный набор. Гарнитура Times.

Отпечатано на ризографе. Усл. печ. л. – 9,5. Уч.-изд. л. – 9,3.

Тираж 100 экз. Заказ №

ИПК БГПУ 450000, г.Уфа, ул. Октябрьской революции, За